

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

MEDITSIINITEADUSTE VALDKOND  
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT  
RNA BIOLOOGIA UURIMISGRUPP

Mariel Mäe

**miR-146a/b mõju interleukiin-1 perekonna geeniekspressioonile bronhiepiteeli rakkudes  
rinoviirusinfektsiooni korral**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Juhendajad MSc Anet Kivihall  
PhD Mariliis Klaas

TARTU 2020

## **miR-146a/b mõju interleukiin-1 perekonna geeniekspressioonile bronhiepiteeli rakkudes rinoviirusinfektsiooni korral**

Astma on krooniline hingamisteede haigus, mille ägenemist põhjustab sageli rinoviirusinfektsioon. Samuti on haiguse korral täheldatud muutunud interleukiin-1 (IL-1) perekonna tsütokiinide ja geeniekspressiooni regulaatori miR-146 perekonna liikmete miR-146a ja miR-146b (miR-146a/b) ekspressiooni. Nende kolme faktori omavahelisi seoseid seoses astma ja astma ägenemisega ei ole veel uuritud, mistõttu oli antud bakalaureusetöö eesmärgiks tuvastada rinoviirusinfektsiooni mõju IL-1 perekonna geenide ekspressioonile ning analüüsida miR-146a/b rolli IL-1 perekonna geenide ekspressiooni reguleerimisel rinoviirusinfektsiooni korral. Käesoleva bakalaureusetöö tulemusena selgus, et rinoviirusinfektsioon põhjustab bronhiepiteeli rakkudes suurenenud IL-1 perekonna geenide ekspressiooni ning miR-146a/b käituvad rinoviirusnakkuse korral IL-1 perekonna geenide negatiivse regulaatorina.

**Märksõnad:** astma, rinoviirus, interleukiin, miR-146, põletik

**CERCS:** B500 Immunoloogia, seroloogia, transplantoloogia

B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

## **The effect of miR-146a/b on the expression of interleukin-1 family genes in bronchial epithelial cells during rhinovirus infection**

Asthma is a chronic respiratory disease that is often exacerbated by rhinovirus infection and differential expression of interleukin-1 (IL-1) family cytokines and gene expression regulator miR-146 family members miR-146a and miR-146b (miR-146a/b) has been detected during asthma. However, the interactions of these three factors in relation to asthma and asthma exacerbation has not yet been elucidated. Therefore, the aim of this study was to analyse the effect of rhinovirus infection to the expression of IL-1 family genes and to elucidate the role of miR-146a/b in the regulation of IL-1 family expression during rhinovirus infection in the bronchial epithelium. As results, we demonstrate increased expression of IL-1 family genes in response to rhinovirus infection in bronchial epithelial cells. Furthermore, our results reveal miR-146a/b to act as negative regulators of IL-1 family genes.

**Keywords:** asthma, rhinovirus, interleukin, miR-146a, inflammation

**CERCS:** B500 Immunology, serology, transplantation

B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

# SISUKORD

SISUKORD .....	3
KASUTATUD LÜHENDID .....	5
SISSEJUHATUS .....	8
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	9
1.1. Astma .....	9
1.1.1. Astma fenotüübid .....	10
1.1.2. Astma ravi .....	11
1.2. Rinoviirus .....	12
1.2.1. Rinoviiruste klassifikatsioon .....	12
1.2.2. Rinoviirusinfektsiooni seos astmaga .....	13
1.3. Tsütokiinid .....	14
1.3.1. Interleukiin-1 perekond .....	14
1.4. MikroRNA-d .....	17
1.4.1. MikroRNA-146 perekond .....	17
1.5. Rakku sisenevad peptiidid .....	19
2. EKSPERIMENTAALOSA .....	21
2.1. Töö eesmärgid .....	21
2.2. Materjal ja meetodika .....	21
2.2.1. Inimese bronhiepiteeli rakkude kasvatamine ja paljundamine .....	21
2.2.2. HBEC rakkude stimuleerimine rinoviirustega .....	22
2.2.3. HBEC rakkude transfekteeimine miRNA miimidega .....	22
2.2.4. Rinoviiruse indutseeritud hiire hingamisteede põletiku mudel .....	22
2.2.5. RNA eraldamine .....	23
2.2.6. RT-qPCR mRNA ekspressiooni uurimiseks .....	23

2.2.7. RT-qPCR miRNA ekspressiooni uurimiseks .....	25
2.2.8. Statistiline analüüs .....	26
2.3. Tulemused.....	27
2.3.1. Rinoviirused stimuleerivad IL-1 perekonna geeniekspressiooni HBEC rakkudes. ....	27
2.3.2. RV infektsioon bronhiepiteeli rakkudes stimuleerib miR-146a/b ekspressiooni.....	31
2.3.3. miR-146a reguleerib RV indutseeritud IL-1 perekonna geeniekspressiooni.....	31
2.3.4. miR-146a/b <sup>-/-</sup> hiirtel on RV nakkuse korral IL-1 ekspressioon kopsus suurenenud....	33
2.4. Arutelu .....	35
KOKKUVÕTE .....	38
TÄNUAVALDUSED .....	40
KASUTATUD KIRJANDUS .....	41
LIHTLITSENTS .....	47

## KASUTATUD LÜHENDID

BEGM	bronhiaalse epiteelraku kasvusööde (ingl <i>bronchial epithelial cell growth medium</i> )
BPE	veise ajuripatsi ekstrakt (ingl <i>bovine pituitary extract</i> )
C/EBP $\beta$	CCAAT enhanserit siduv valk $\beta$ (ingl <i>CCAAT-enhancer-binding protein beta</i> )
CDHR3	inimese kadheriini valguperekonda kuuluv liige 3 (ingl <i>cadherin related family member 3</i> )
cDNA	komplementaarne DNA
CPP	rakku sisenev peptiid (ingl. <i>cell-penetrating peptide</i> )
DAMP	ohuga seotud molekulaarsed mustrid (ingl. <i>danger-associated molecular patterns</i> )
DGRC8	DiGeorge sündroomi kriitilise regiooni geen 8 (ingl <i>DiGeorge syndrome critical region gene 8</i> )
EF1A	elongatsioonifaktor-1 alfa (ingl <i>elongation factor 1-alpha</i> )
ELISA	ensüümseotud immuunsorbentanalüüs (ingl <i>the enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
HBEC	inimese bronhiaalsed epiteeli rakud
hEGF	inimese epidermaalne kasvufaktor (ingl <i>human epidermal growth factor</i> )
HPRT	hüpoksantiini fosforibosüültransferaas (ingl <i>hypoxanthine phosphoribosyl-transferase</i> )
ICAM1	intratsellulaarne adhesioonimolekul 1 (ingl <i>intercellular adhesion molecule 1</i> )
IgE	immuunglobuliin E
IL	interleukiin
IL-1RI	IL-1 tüüp I retseptor
ILC2	loomuliku immuunsuse tüüp 2 lümfoidrakk (ingl <i>innate lymphoid cell 2</i> )
IRAK1	IL-1 retseptori vahendatud kinaas 1 (ingl <i>interleukin-1 receptor-associated kinase 1</i> )

IRF3/7	interferooni reguleeriv faktor 3/7 (ingl <i>interferon regulatory factor 3/7</i> )
LABA	pika toimega beeta-2-agonist (ingl <i>long-acting beta agonist</i> )
LDLR	madala tihedusega lipoproteiini retseptor (ingl <i>low density lipoprotein receptor</i> )
miR-146	mikroRNA-146
miRNA	mikroRNA
MOI	nakatuskordsus (ingl <i>multiplicity of infection</i> )
mRNA	informatsiooni-RNA (ingl <i>messenger RNA</i> )
NF-κB	tuumafaktor κB (ingl <i>nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells</i> )
NK-rakud	loomulikud tapjarakud (ingl <i>natural killer cells</i> )
PAMP	patogeenidega seotud molekulaarsed mustrid (ingl. <i>pathogen-associated molecular patterns</i> )
PBS	fosfaat-puhverdatud saliin (ingl <i>phosphate-buffered saline</i> )
PF14	PepFect14
Ran-GTP	guanosiintrifosfaati siduv RAS seoseline tuumavalk (ingl. <i>RAS-related nuclear protein</i> )
RISC	RNA indutseeritud vaigistamiskompleks (ingl <i>RNA-induced silencing complex</i> )
RSV	respiratoor-süntsütiaalne viirus
RT-qPCR	reaalaja polümeraasi ahelreaktsioon (ingl <i>reverse transcription quantitative polymerase chain reaction</i> )
RV	rinoviirus
SEM	standardviga (ingl <i>standard error of the mean</i> )
STAT3	signaali transduktsiooni ja transkriptsiooni aktivaator (ingl <i>signal transducer and activator of transcription 3</i> )
TCID	50% rakukultuuri nakatav doos (ingl <i>tissue culture infective dose 50%</i> )
Th17	tüüp 17 abistaja rakk (ingl <i>T-helper 17</i> )

Th2	tüüp 2 abistaja rakk (ingl <i>T-helper 2</i> )
TLR	tolli-laadsed retseptorid
TRAF6	TNF retseptori vahendatud faktor 6 (ingl <i>TNF receptor associated factor 6</i> )
TSLP	tüümuse stromaalne lümfoepoetiin (ingl <i>thymic stromal lymphopoietin</i> )
Wt	metsiktüüp (ingl <i>wildtype</i> )
3'UTR	3' transleerimata regioon (ingl. <i>3' untranslated region</i> )

# SISSEJUHATUS

Astma on hingamisteede krooniline põletikuline haigus, mida esineb ligi 300 miljonil inimesel üle maailma ning seda iseloomustavad korduvad õhupuuduse hood ja hingeldamine (Bleecker *et al.*, 2016, Sun *et al.*, 2019). Rinoviirused põhjustavad tavaliselt hingamisteedes külmetushaigusi (Rossi ja Colin 2015), kuid astma haigetel võib selle nakkusega kaasneda astma ägenemine ja hingamisraskuste teke (Han *et al.*, 2019). MiRNA-d on posttranskriptsioonilises geeniekspressiooni regulatsioonis osalevad lühikesed üheaahelised RNA järjestused, mis mõjutavad ka erinevate haiguste teket ja kulgu (Comer *et al.*, 2014, Rebane ja Akdis 2014). Varasemad uuringud on näidanud, et tsütokiinide interleukiin-1 perekond osaleb immuunsüsteemi regulatsioonis ja põletikulistes protsessides ning astma patsientidel on leitud suurenenud interleukiin-1 perekonna ekspressioon (Dinarello *et al.*, 2012, Rossios *et al.*, 2018). Samuti on astma patsientidel tuvastatud erinevate miRNA-de, sealhulgas miR-146a/b, muutunud ekspressiooni hingamisteedes (Heffler *et al.*, 2017). Hetkel ei ole veel teada, milline on miR-146a/b ja interleukiin-1 perekonna omavaheline seos ning kas ja kuidas need faktorid osalevad astma ägenemise tekkes bronhiepiteeli rinoviirusinfektsiooni korral.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk on uurida, milline on interleukiin-1 perekonna geenide ekspressioon inimese bronhiepiteeli rakkudes ja hiire hingamisteedes rinoviirusega nakatumisel ning analüüsida, kas ja kuidas sõltub interleukiin-1 ekspressioon miR-146a/b tasemest bronhiepiteelis rinoviirusinfektsiooni korral.

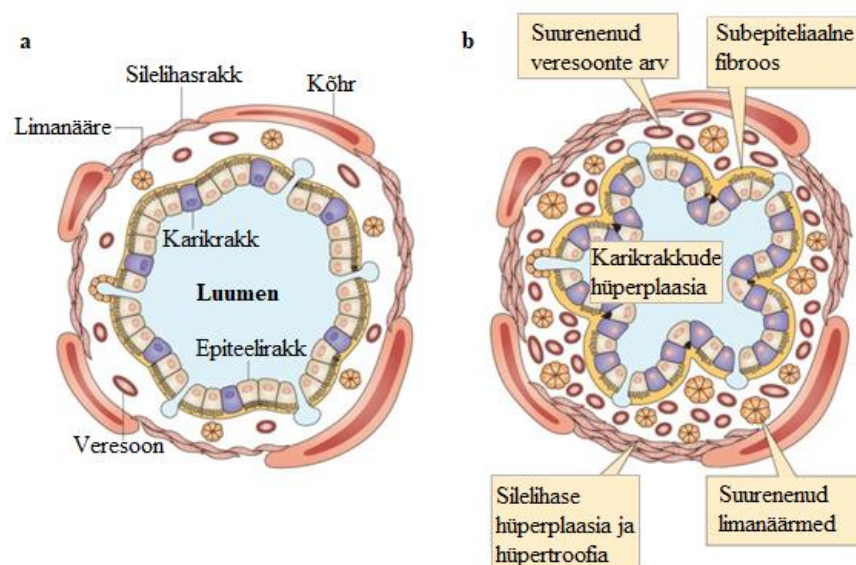
Käesolev bakalaureusetöö on valminud Tartu Ülikooli geenitehnoloogia õppekava raames. Töös läbiviidud eksperimentaalsed katsed teostati Tartu Ülikooli meditsiiniteaduste valdkonnas, biomeditsiini osakonnas, bio- ja siirdemeditsiini instituudis, RNA bioloogia uurimisgrupis.



# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Astma

Astma on krooniline hingamisteede haigus, mida iseloomustab bronhiaalne põletik. Astma võib tekkida juba imikueas või varajases lapsepõlves, kuid erinevate faktorite mõjul (näiteks kokkupuutel hingamisteede ärritantidega nagu kemikaalid, allergeenid, viirused) võib see ilmned ka täiskasvanutel (Lemanske ja Busse 2010). Võrreldes terve inimese bronhiepiteeliga, mis koosneb erinevatest rakutüüpidest, mis tagavad hingamisteede normaalse homöostaasi, tekivad astma esinemise korral inimese hingamisteedes põletikust tingitud histoloogilised muutused (joonis 1) (Mitchell ja O'Byrne 2017). Astma patsientidel võib haiguse tõttu esineda karikrakkude metaplaasia ja hüperplaasia ning sellega muutub rips- ja karikrakkude arvuline suhe. Astma korral suurenevad ka silelihasrakkude hulk ja suurus, veresoonte ja limanäärmete arv, lima eritus. Samuti tekib astma haigetel subepiteeliline fibroos, mille käigus suureneb kollageeni ladestumine epiteelialusesse basaalmembraani (Kudo *et al.*, 2013, Fahy 2015). Kõik eelnevalt nimetatud astmaga kaasnevad histoloogilised muutused põhjustavad omakorda hingamisteede ülitundlikkust ning tekitavad astmale iseloomulikke sümptomeid nagu korduvad õhupuuduse hood ja hingeldamine (Mitchell ja O'Byrne 2017, Sun *et al.*, 2019).



**Joonis 1. Astmaga kaasnevad inimese hingamisteede histoloogilised muutused.** Joonisel on kujutatud terve inimese bronhiepiteel (a) ja astmaatikule iseloomulik bronhiepiteel (b). Modifitseeritud Fahy, 2015 järgi.

### **1.1.1. Astma fenotüübid**

Astma on heterogeenne haigus ning see jaguneb hingamisteedes esinevate immuunrakkude alusel 3 fenotüübiks: allergiline astma, mitteallergiline eosinofiilne astma ja mitteeosinofiilne astma (Froidure *et al.*, 2016).

#### **1.1.1.1. Allergiline astma**

Allergiline astma on üks kõige enam levinud astma fenotüüpe ning seda iseloomustab suurenenud eosinofiilide hulk hingamisteedes. Allergiline astma on päriliku eelsoodumusega ning tekib tavaliselt juba varajases eas. Allergilise astma korral põhjustab kokkupuude sissehingatavate allergeenidega omandatud immuunsuse käivitamise ja tüüp 2 abistaja rakkude (Th2) (ingl *T-helper* 2) vahendatud põletiku tekke (Froidure *et al.*, 2016, Sun *et al.*, 2019). Omandatud immuunsüsteemi käivitamisel on oluline roll dendriitrakkudel. Dendriitrakud tunnevad ära hingamisteedes olevad antigeenid ning liiguvad lümfisõlme, kus esitlevad antigeene naiivsetele CD4<sup>+</sup> T-lümfotsüütidele (El-Gammal *et al.*, 2016). CD4<sup>+</sup> T-lümfotsüüdid alustavad GATA3 transkriptsioonifaktori ekspresseerimist ning diferentseeruvad Th2 rakkudeks (Hosokawa *et al.*, 2016). Ka Th2 rakkudes jätkub GATA3 ekspresseerimine, et aktiveerida Th2 rakkudele iseloomulike tsütokiinide IL-4, IL-5 ja IL-13 ekspressiooni. Nende tsütokiinide ekspressioon ja sekretsioon omakorda põhjustab basofiilide ja nuumrakkude degranulatsiooniks vajaliku immuunglobuliin E (IgE) tootmise, eosinofiilide migreerumise hingamisteedesse ning karikrakkude vahendatud lima tootmise ja hingamisteede silelihaste kokkutõmbed (Yashiro *et al.*, 2015). IgE tootmiseks on oluline IL-4, mis põhjustab immunoglobuliini isotüübi vahetumist IgE-ks ja selle sünteesi (Kobayashi *et al.*, 2017).

#### **1.1.1.2. Mitteallergiline eosinofiilne astma**

Teine väga levinud astma fenotüüp täiskasvanute seas on mitteallergiline eosinofiilne astma. Sarnaselt allergilisele astmale, esineb ka mitteallergilise eosinofiilse astma puhul hingamisteede eosinofiilia, kuid vastupidiselt allergilisele astmale, on mitteallergilise eosinofiilse astma korral näidatud kaasasündinud immuunsüsteemi osalust ja allergeeni spetsiifiliste IgE antikehade puudumist vereseerumis (Lee *et al.*, 2020). Samuti tekib mitteallergiline astma fenotüüp hilisemas eas, kui allergiline eosinofiilne astma ning on rohkem mõjutatud keskkonnategurite kui geneetiliste faktorite poolt (Froidure *et al.*, 2016). Mitteallergilise eosinofiilse astma patsientidel ekspresseerivad hingamisteede epiteelirakud tsütokiine IL-25, IL-33 ja TSLP (ingl *Thymic stromal lymphopoietin*), mis põhjustavad põletiku teket (Liang *et al.*, 2020). IL-33 kutsus esile ka

Th2 tüüpi põletikule iseloomulike IL-5 ja IL-13 tsütokiinide ekspressiooni loomuliku immuunsuse tüüp 2 lümfoidrakkude (ILC2) (ingl *innate lymphoid cell 2*) poolt, et kaasata ka eosinofiile, mis tugevdavad põletikulist protsessi (Gasiuniene *et al.*, 2019, Lee *et al.*, 2020).

#### **1.1.1.3. Mitteeosinofiilne astma**

Kolmas astma fenotüüp on mitteeosinofiilne astma, mis omakorda jaguneb neutrofiilseks astmaks, segavormi astmaks ja pautisgranulotsütaarseks astmaks ehk rakuvaeseks astmaks (Demarche *et al.*, 2016). Neutrofiilse astma korral puudub Th2-tüüpi või eosinofiilne põletik ning neutrofiilide sattumist hingamisteedesse põhjustab Th17 rakkude aktivatsioon. IgE roll on mitteeosinofiilse astma fenotüübi korral teadmata, kuid on seoseid IL-17, IL-33 ja ADAM8-ga. Neutrofiilne põletik esineb peamiselt raskemate astma juhtumite korral ning olukorda muudab tõsisemaks fenotüübi resistentsus kortikosteroidide suhtes (Froidure *et al.*, 2016, Li *et al.*, 2016).

Pautisgranulotsütaarset astmat iseloomustab üldine immuunrakkude vähesus hingamisteedes ehk neutrofiile kui ka eosinofiile esineb vähe, mistõttu peetakse seda astma fenotüüpi ka mittepõletikuliseks või madala astme hingamisteede põletikuks (Demarche *et al.*, 2016). Üldjuhul on see fenotüüp hästi kontrollitav, kuid esineb ka raskemaid juhtumeid, mis ei allu kortikosteroidide ravile (Carr *et al.*, 2018).

Segavormi astma on vähe levinud mitteeosinofiilse astma fenotüübi vorm, mille puhul esineb nii suurenenud neutrofiilide kui ka eosinofiilide tase. Selle vormi korral esineb nõrgenenud kopsutalitlus ja vajatakse sagedamini oraalset kortikosteroidide teraapiat. (Froidure *et al.*, 2016)

#### **1.1.2. Astma ravi**

Astma uuringute eesmärk on saada infot haiguse molekulaarsete mehhanismide kohta, mis aitaks kaasa uute meetodite välja töötamisele, millega õnnestuks astma kui haiguse teket ennetada, kuid seda pole veel saavutatud. Seetõttu seisneb praegune astma ravi optimaalse kontrolli leidmises haiguse sümptomite üle, samal ajal püüdes võimalikult palju vältida raviga kaasnevaid kõrvalmõjusid. Kuna tegemist on väga mitmekesise haigusega, valitakse igale individuaalsele astma patsiendile ravimeetodid vastavalt nende vanusele ja haiguse kulgemisele. (Lemanske ja Busse 2010, Croteau-Chonka *et al.*, 2017)

Astma sümptomite kontrolli all hoidmiseks manustatakse patsientidele peamiselt kortikosteroide või pika toimega beeta-2-agoniste (LABA) (ingl *Long-acting beta-agonists*) ja kortikosteroide kombineeritult, kuid need ravimeetodid ei ole kõikide patsientide puhul efektiivsed (Bleecker *et*

*al.*, 2016). Kortikosteroidid seonduvad organismis glükokortikoid retseptoritega, mis translokeeruvad rakutuumas ja indutseerivad antiinflammatoorsete geenide ekspressiooni või inhibeervad proinflammatoorsete geenide avaldumist. Osadel patsientidel võib aga esineda vähenenud tundlikkus kortikosteroididele, mida põhjustab glükokortikoidide retseptori langenud võime seonduda DNA-ga või on suurenenud proinflammatoorsete transkriptsioonifaktorite ekspressioon (Chang *et al.*, 2015). LABA-sid kasutatakse hingamisteede silelihase lõdvestamiseks ning kuigi esineb mitmeid hoiatusi nende võimaliku ohtlikkuse kohta, ei ole LABA kasutamine langenud. LABA monoterapia, mida seostatakse suurema surmariskiga, on vähe levinud (Hartung *et al.*, 2015, Price *et al.*, 2016, Vos *et al.*, 2016).

Lisaks on levinud monoklonaalsete antikehade kasutamine astma sümptomite kontrollimiseks. Näiteks raske allergilise astma korral kasutatakse tihti ravimit Omalizumab (Xolair), mis seondub IgE-ga ja aitab alla suruda immuunrakkude vastuseid (Maltby *et al.*, 2017). Eosinofiilse põletikuga raske astma ravimiseks kasutatakse IL-5 retseptor  $\alpha$  vastast monoklonaalset antikeha Benralizumab, mis vähendab eosinofiilide arvu kasutades NK-rakke (ingl *Natural killer cells*) (Bleecker *et al.*, 2016). Mitteeosinofiilse astma puhul ei ole laialt levinud ravimeid, kuid üks potentsiaalne meetod on kasutada makroliide, mis suruvad alla immuunrakkude tungimist hingamisteedesse ja tugevdavad organismi vastust steroididele (Essilfie *et al.*, 2015).

## **1.2. Rinoviirus**

Rinoviirus (RV) on *Picornaviridae* sugukonda kuuluv viirus, mis sisaldab üheaheelalist RNA-d ja ikosaeedrilist kapsiidi (Han *et al.*, 2019). Rinoviirused on võimelised inimesi nakatama ning põhjustama külmetushaiguseid, mis mõjutavad nii ülemisi kui ka alumisi hingamisteid (Rossi ja Colin, 2015). Hingamisteede infektsioonid, nagu rinoviirus, aga ka influenza viirus ja respiratoorsüntsüüaalse viirusnakkus (RSV), on ühed levinumad astma ägenemise põhjused nii laste kui täiskasvanute seas (Han *et al.*, 2019) (Sun *et al.*, 2019).

### **1.2.1. Rinoviiruste klassifikatsioon**

Rinoviirusel on üle 165 serotüüpi, mis jagunevad nukleotiidjärjestuse sarnasuse alusel kolme alamliiki: A, B ja C. A ja B alamliigi serotüübid klassifitseeruvad vastavalt rakkudesse sisenemiseks kasutatavale retseptorile suurde ja väiksesse gruppi (*major and minor group*). Suure grupi moodustavad serotüübid, mis seonduvad intratsellulaarse adhesioonimolekuli 1 (ICAM1) retseptoriga, ning suurde gruppi kuuluvad enamuse A alamliigi ja kõik B alamliigi serotüübid.

Väikeses grupis on ülejäänud A alamliigi viirused ning nemad kasutavad retseptorina madala tihedusega lipoproteiini retseptor (LDLR) perekonna liikmeid. C alamliigi viirused kinnituvad inimese kadheriini valguperekonda kuuluv liige 3 retseptorile (CDHR3) (ingl. *Cadherin related family member 3*). (Lewis-Rogers *et al.*, 2017)

Käesolevas bakalaureusetöös kasutati primaarsete bronhiepiteeli rakkude stimuleerimiseks suure grupi rinoviirust A16 ja väikse grupi rinoviirust 1B. Suure grupi rinoviirused ei ole võimelised hiiri nakatama, sest ICAM1 retseptor erineb liikide vahel. Väikse grupi RV LDL retseptor on aga inimesel ja hiirel konserveerunud, mistõttu uuriti *in vivo* vaid RV 1B mõju IL-1 perekonna geeniekspressioonile. Vaatamata oma erinevustele on varasemad publikatsioonid näidanud, et rinoviirus A16 ja 1B kutsuvad HBEC rakkudes esile sarnaseid kemokiini vastuseid. (Newcomb *et al.*, 2008)

### **1.2.2. Rinoviirusinfektsiooni seos astmaga**

Erinevalt teistest viirustest (nagu influenza, adenoviirus, RSV) indutseerivad rinoviirused rakkudes minimaalseid tsütotoksilisi efekte ning tekitavad selle asemel põletikulisi reaktsioone (Rossi ja Colin 2015). RV replitseerub peremeesraku tsütoplasmas ning maksimaalse replikatsiooni toimumiseks on oluline hoida tasakaalus apoptoos ja põletik, mida viirus ja peremeesrakk indutseerivad. Bronhiepiteelis paiknevad tolli-laadsed retseptorid (TLR) on võimelised RV-d ära tundma ja immuunvastust esile kutsuma (Girkin *et al.*, 2017). Viirusest vabanemiseks ekspresseerivad RV-ga nakatunud epiteelrakud kemokiine ja pro-inflammatoorseid tsütokiine, mis koostöös põhjustavad immuunrakkude liikumist hingamisteedesse, tekitavad põletikku. Võrreldes terve inimesega võib astma haigetel olla hingamisteede epiteelikiht juba olemasoleva kroonilise põletiku tõttu kahjustunud ning see muudab neid nakkustele vastuvõtlikumaks, sest epiteel on tavaliselt esimeseks kaitsebarjääriks viirusinfektsioonide vastu (Gern 2015). RV nakkuse vastu võitlemiseks aktiveeritakse ka kaasasündinud immuunsüsteem, mille tüüp-1 interferoonid osalevad varajases immuunvastuses (Blaas ja Fuchs 2016). Samas on astmaga patsientide HBEC rakkude *in vitro* katsete puhul märgatud mitmete interferoonide taseme langust. Interferoonid on olulised viiruse leviku piiramises ning nende madalam ekspressioon võib samuti viia astma ägenemiseni. Samas on ka vastuolulisi tulemusi, mis näitavad, et astma korral ei ole interferoonide vastused märkimisväärselt muutunud (Gern 2015, Hansel *et al.*, 2017). Mõlemal juhul põhjustab RV infektsioon astma haigetel tugeva immuunvastuse teket, mis omakorda võib soodustada hingamisteede kahjustuste teket, süvendada astma sümptomeid ja põhjustada haiguse ägenemist. Näiteks on uuringud näidanud, et 80%

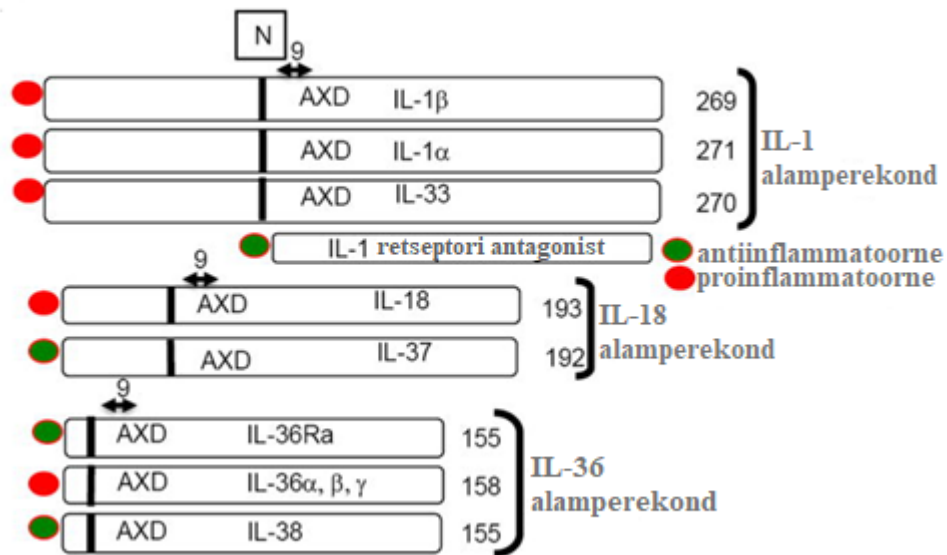
koolilastest, kellel esines vilisevat hingamist ja hingeldamist, olid nakatunud viirusesse ja kõige enam tuvastati just RV nakkust (Johnston *et al.*, 1995). Samuti on leitud, et umbes pool täiskasvanud astma patsientide haiguse ägenemisest on põhjustatud RV infektsioonist (Nicholson *et al.*, 1993), kuid viiruseid ja astmat siduvad täpsed molekulaarsed mehhanismid ei ole seni teada (Han *et al.*, 2019).

### **1.3. Tsütokiinid**

Tsütokiinid on väikesed sekreteeritavad signaalvalgud, mille ülesanne on läbi viia rakkudevahelist suhtlust immuunvastuse käigus. Tsütokiinide sekreteerimine toimub lühikese ajavahemiku jooksul ning madal kontsentratsioon on piisav, et organismis ülesandeid läbi viia (Thurley *et al.*, 2015). Tsütokiinide signalisatsioon võib olla autokriinne ehk sekreteeritud signaal mõjutab rakku ennast, parakriinne, mille korral sekreteeritud signaal mõjutab naaberrakku, või endokriinne, kus sekreteeritud signaal levib vereringega ja mõjutab rakke globaalselt (Altan-Bonnet ja Mukherjee 2019). Tänapäeval on teada sadu tsütokiine, mille hulka kuuluvad interleukiinid, lümfokiinid, kemokiinid, interferoonid ja kasvufaktorid. Interleukiinideks on nimetatud üle 60 tsütokiini ning esimesena kirjeldati interleukiin-1 (Akdis *et al.*, 2016, Becher *et al.*, 2017).

#### **1.3.1. Interleukiin-1 perekond**

Interleukiin-1 (IL-1) perekond on grupp tsütokiine, mida seostatakse akuutse ja kroonilise põletikuga (Dinarello *et al.*, 2012). Muutusi IL-1 tsütokiinide ekspressioonis on leitud ka astma patsientidel, näiteks on täheldatud suurenenud IL-1 perekonna retseptorite ekspressiooni rögas (Rossios *et al.*, 2018). IL-1 perekonda kuuluvad 11 liiget, mis jagunevad pro- ja antiinflammatoorseteks tsütokiinideks (joonis 2) (Garlanda *et al.*, 2013).



**Joonis 2. Interleukiin-1 perekond.** IL-1 perekonnas on 11 liiget, mis jagunevad N-terminaalse predomeeni pikkuse (näidatud aminohapete arvuga) alusel alamperekondadesse. IL-1 perekonna liikmed (v.a. IL-1 Ra) on tsütoplasmas prekursoritena, mille lõikamispiirkond (N) asub konserveerunud kolme aminohappelisest konsensusjärjestusest A-X-D (A – alifaatne aminohape, X – mistahes aminohape, D - asparagiinhape) 9 aminohapet N-terminali poole. Modifitseeritud Garlanda, Dinarello ja Mantovani, 2013 järgi.

### 1.3.1.1. IL-1 alamperekond

IL-1 alamperekond koosneb neljast liikmest: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1Ra ja IL-33 (van de Veerdonk ja Netea 2013). Kõige enam on uuritud proinflammatoorsete tsütokiinide IL-1 $\alpha$  ja IL-1 $\beta$  ekspressiooni ja funktsiooni. IL-1 $\alpha$  ja IL-1 $\beta$  on erinevate geenide poolt kodeeritud, kuid mõlemad seonduvad IL-1 tüüp I retseptoriga (IL-1RI). Samuti tunnevad nad ära tüüp II retseptori, kuid see ei osale IL-1 signaali edasiandmises (Garlanda *et al.*, 2013, Akdis *et al.*, 2016). Mõlemad tsütokiinid sünteesitakse prekursorina, mis vajab küpse funktsionaalse vormi saavutamiseks proteolüütilist lõikamist (Dagenais *et al.*, 2017).

IL-1 $\alpha$  transleeritakse pro-IL-1 $\alpha$ -ks ning seda leidub konstantselt mitmete rakkude ja organite epiteelikihtides (Garlanda *et al.*, 2013). Funktsionaalset lühikest IL-1 $\alpha$  vormi on võimalik saada intratsellulaarselt, kui prekursorit lõikab proteaas kalpainen, või ekstratsellulaarselt, kui lõikamine toimub gransüüm B, elastaasi või muu ensüümi poolt. IL-1 $\alpha$  on aktiivne nii lõikamata prekursorina kui ka lõigatud vormis (Dagenais *et al.*, 2017). IL- $\alpha$  tsütokiin on oluline põletiku

varajastes faasides, indutseerides teiste põletikuliste tsütokiinide ja kemokiinide kaskaadi (Garlanda *et al.*, 2013).

Sarnaselt IL-1 $\alpha$ -le transleeritakse ka IL-1 $\beta$  pro-IL1 $\beta$ -ks, kuid sellel puudub aktiivsus (Akdis *et al.*, 2016). Aktiivse vormi saamist indutseerib signaal rakkudelt, mis on patogeenidega seotud molekulaarsete mustrite (PAMP-de) (ingl. *pathogen-associated molecular patterns*) või ohuga seotud molekulaarsete mustrite (DAMP-de) (ingl. *danger-associated molecular patterns*) poolt stimuleeritud, ning seejärel on vajalik töötlus inflammasoomide ja kaspas-1 poolt (Orlowski *et al.*, 2015).

IL-1Ra on antiinflammatoorsete omadustega retseptori antagonist, mida ekspresseeritakse samal ajal IL-1-ga. IL-1Ra seondub IL-1 tüüp I retseptorile ning IL-1Ra kõrge ekspressiooni korral ei saa IL-1 $\alpha$  ja IL-1 $\beta$  retseptoriga seonduda ehk IL-1Ra takistab IL-1 signaalide edasiandmist (Dinarello *et al.*, 2012, Akdis *et al.*, 2016). Kuna IL-1 $\alpha$  ja IL-1 $\beta$  on võimelised rakke laialdaselt mõjutama isegi juhul, kui retseptoritega on seondunud 5% tsütokiine, siis soovitud inhibitoorse efekti saamiseks vajatakse üldjuhul IL-1 $\alpha$ -st või IL-1 $\beta$ -st kuni 100 korda suuremat IL-1Ra kontsentratsiooni (Pasi *et al.*, 2015, Nouhin *et al.*, 2017).

#### **1.3.1.2. IL-18 alamperekond**

IL-18 alamperekond koosneb proinflammatoorsest IL-18 ja antiinflammatoorsest IL-37 tsütokiinist, mis mõlemad seonduvad IL-18 retseptoriga. IL-18 toodavad mitmed põletikulised rakud ning see tsütokiin on võimeline suurendama IL-37 taset. IL-37 vaigistamine põhjustab IL-1 $\beta$  poolt indutseeritud tsütokiinide taseme suurenemist, mis viitab IL-37 rollile põletiku vähendamises. (Garlanda *et al.*, 2013, Akdis *et al.*, 2016)

#### **1.3.1.3. IL-36 alamperekond**

IL-36 alamperekonda kuuluvad proinflammatoorsed IL-36 $\alpha$ ,  $\beta$  ja  $\gamma$  ning antiinflammatoorsed IL-38 ja IL-36Ra, mis kõik seonduvad IL-36 retseptoriga. IL-36Ra inhibeerib IL-36 $\alpha$ ,  $\beta$  ja  $\gamma$ , mis on levinud kaasasündinud ja omandatud immuunsüsteemi regulaatorid. IL-38 homoloogsus IL-1Ra ja IL-36Ra-iga viitab IL-38 antagonistlikkule toimele. (Garlanda *et al.*, 2013, Akdis *et al.*, 2016)



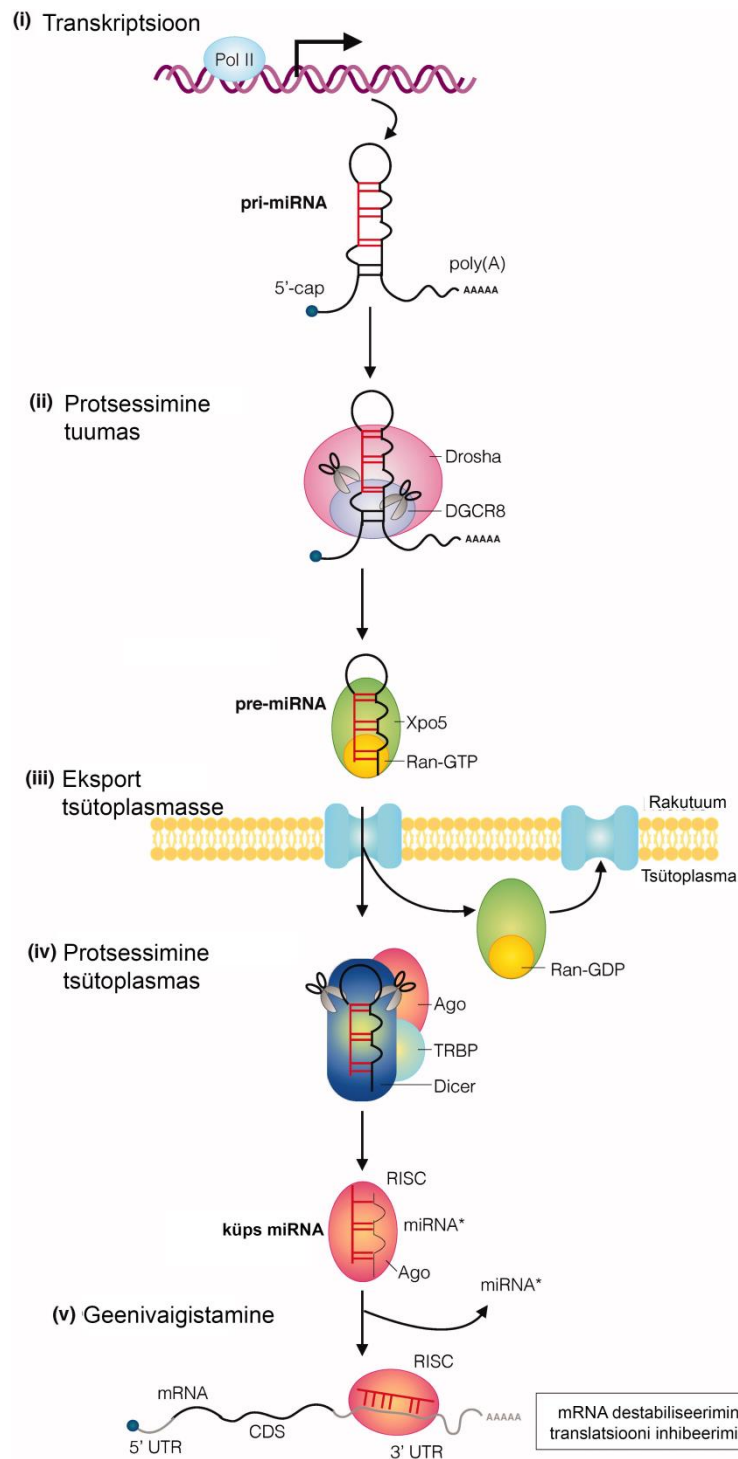
## 1.4. MikroRNA-d

MikroRNA-d (miRNA-d) on lühikesed ~22 nukleotiidi pikkused üheaahelalised RNA järjestused, mis on olulised posttranskriptsioonilises geeniekspressiooni regulatsioonis. Pri-miRNA-d transkribeeritakse rakutuumas RNA polümeraas II abil, millele järgneb lõikamine ensüüm Drosha ja kofaktor DGRC8 kompleksi poolt (Joonis 3). Saadud pre-miRNA eksporditakse Exportin-5 ja Ran-GTP kompleksi kasutades tsütoplasmasse, kus jätkub protsessimine Dicer ensüümiga ning moodustuvad miRNA dupleksid. miRNA duplexi üks ahel liitub RNA indutseeritud vaigistamiskompleksiga (RISC) (ingl *RNA-induced silencing complex*) ja seejärel kinnitub miRNA 6-8 nukleotiidi pikkuse seemnejärjestuse alusel sihtmärk mRNA 3' transleerimata regioonile (3'UTR) (ingl. *3' untranslated region*) ning inhibeerib mRNA translatsiooni või põhjustab mRNA degradeerumise (Rebane ja Akdis 2014, Hata ja Kashima 2016). miRNA ja sihtmärk mRNA ei ole täielikult komplementaarsed, mistõttu mikroRNA saab samaaegselt reguleerida mitut erinevat mRNA-d ja seeläbi mõjutada rakkudes palju erinevaid protsesse nagu areng, rakusurm ja erinevad haigused (Plank *et al.*, 2015, Wilczynska ja Bushell 2015, Sun *et al.*, 2017). Astma patsientide hingamisteedes ja ka astma hiiremodelites on leitud muutunud miRNA tasemeid ning arvatakse, et miRNA-de ekspressioon võib olla seotud astma arenguga (Rebane ja Akdis 2014, Kivihall *et al.*, 2019).

### 1.4.1. MikroRNA-146 perekond

MikroRNA-146 (miR-146) perekonna liikmed miR-146a ja miR-146b (miR-146a/b) on põletiku negatiivsed regulaatorid mitmes rakutüübis, k.a. epiteelirakkudes. Hiire astma mudelis on näidatud mõlema miRNA suurenenud ekspressiooni kopsudes (Garbacki *et al.*, 2011, Comer *et al.*, 2014). miR-146-l on mitu põletikuga seotud sihtmärki, mille hulka kuuluvad IL-1 retseptori vahendatud kinaas 1 (IRAK1) ja TNF retseptori vahendatud faktor 6 (TRAF6). Mõlemad on olulised valgud NF- $\kappa$ B signalisatsiooni kaskaadis ning nende vaigistamine inhibeerib signaaliraja aktivatsiooni ehk miR-146 perekond toimib NF- $\kappa$ B negatiivse regulaatorina (Park *et al.*, 2015, Pfeiffer *et al.*, 2017).

miR-146a ja miR-146b on homologsete järjestustega miRNA-d, mida kodeeritakse inimesel vastavalt 5. ja 10. kromosoomis asuvatelt geenidelt. miR-146a geeniekspressiooni indutseerib NF- $\kappa$ B signaalirada vastusena kaasasündinud immuunsuse aktiveerimisele (Park *et al.*, 2015, Paterson ja Kriegel 2017).



**Joonis 3. Mikro-RNA biogenees.** Rakutuumas transkribeerib RNA polümeraas II pri-miRNA, millest Drosha ja DGCR8 kompleksi poolse protsessimise tulemusena saab pre-miRNA, mis transporditakse Exportin-5 ja Ran-GTP abil tsütoplasmasse. Tsütoplasmas jätkub Dicer ensüümi abil protsessimine küpseks miRNA-ks, mille üks ahel liitub RISC kompleksiga. Seejärel on miRNA võimeline seonduma sihtmärk mRNA-ga ja geeni vaigistama. Modifitseeritud Hata ja Kashima, 2015 järgi.

Erinevalt miR-146a-st reguleerib miR-146b ekspressiooni STAT3, mille aktiveerumiseks on olulised Janus kinaasid (Xiang *et al.*, 2014). miR-146a ja miR-146b transkriptsioon ei toimu alati samaaegselt ning ekspressiooni regulatsioonis omavad olulist rolli erinevad transkriptsioonifaktorid. Mõlema miR-146 perekonna liikme puhul on välja toodud C/EBP $\beta$  (ingl *CCAAT-enhancer-binding protein beta*) osalust, kuid miR-146a transkriptsioonifaktorite hulgas on lisaks mainitud IRF3/7 (ingl *Interferon regulatory factor 3/7*) ja c-Myc (Paterson ja Kriegel 2017).

## 1.5. Rakku sisenevad peptiidid

Enamik nukleiinhapetel baseeruvaid molekule ei ole oma suuruse ja negatiivse laengu tõttu võimelised rakumembraani läbima (Margus *et al.*, 2016, Gestin *et al.*, 2020), mistõttu on vajalik leida alternatiivne võimalus molekulide sisestamiseks rakkudesse. Rakku sisenevad peptiidid (CPP-d) (ingl. *cell-penetrating peptides*) on 5-30 aminohappest koosnevad peptiidid, mis on võimelised läbima rakumembraane (Patel *et al.*, 2019). Lisaks saab CPP-le lisada kargona mitmeid nukleiinhapetel baseeruvaid molekule, nagu RNA-d (k.a. miRNA) (Margus *et al.*, 2016, Urgard *et al.*, 2016) ja plasmiidset DNA-d (Arukuusk *et al.*, 2013), ja molekule seeläbi rakkudesse transportida. Võrreldes lipiidsete transporteritega on CPP-de puhul näidatud madalat toksilisust ja immunogeensust rakkudele ning see muudab peptiidid heaks transfekteeerimise meetodiks (Sun *et al.*, 2017). Üks levinud oligonukleotiidide transpordiks kasutatav CPP on PepFect14 (PF14), mis on katioonne ja amfipaatse struktuuriga. PF14 struktuur võimaldab tekkida iseeneslikult moodustuvatel nanopartiklitel, milles transporditav oligonukleotiid on mittekovalentselt seondunud PF14-ga. Moodustuv nanopartikkel kaitseb oligonukleotiide nukleaaaside eest ning takistab komplekside dissotsiatsiooni kokkupuutel teiste ionidega (Gestin *et al.*, 2020).

Rakku sisenevad peptiidid kasutavad rakumembraani läbimiseks peamiselt endotsütoosi või otsest membraani läbimist, kuid arvatakse, et otsest translokatsiooni kutsub esile CPP kontsentratsiooni suurendamine, mis omakorda võib rakkudele põhjustada kõrget tsütotoksilisust. Endotsütoosi teel rakkudesse sisenemisel on omakorda võimalik eristada klatriin-sõltuvat, kaveoliin-sõltuvat, klatriinist- ja kaveoliinist sõltumatut endotsütoosi ja makropinotsütoosi (Pan *et al.*, 2016). CPP-de sisenemismehhanism ei ole täielikult selge, kuid on teada erinevate retseptorite osalusest. Näiteks kasutatakse võimalikult edukaks kohaletoimetamiseks nanopartiklite pinnal ligande, millel on kõrge afiinsus spetsiifilise rakuliini või koe retseptori

suhtes (Gestin *et al.*, 2020). Lisaks on PF14 ja oligonukleotiidide kompleksi sisenemisel näidatud seost autofaagia mehhanismiga, mille puhul nanopartiklid asuvad autofagosoomides, mis eraldab neid tsütoplastmast. Sellisel juhul on oligonukleotiidide efektiivsus piiratud, sest ainult väike osa on võimeline jõudma sihtmärgini (Dowaidar *et al.*, 2017). Komplekside endosoomist põgenemine on oligonukleotiidide funktsionaalsuse tagamiseks oluline ning selle soodustamiseks kasutatakse näiteks histidiinirikaste struktuuride lisamist või peptiidi modifitseerimist rasvhapetega (Arukuusk *et al.*, 2013).

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk oli teha kindlaks, kuidas miR-146a/b mõjutavad interleukiin-1 perekonna geeniekspressiooni bronhiepiteeli rakkudes rinoviirusinfektsiooni korral.

Bakalaureusetöö täpsemad eesmärgid olid:

1. analüüsida, milline on interleukiin-1 perekonna geenide ekspressioon inimese bronhiepiteeli rakkudes RV infektsiooni korral
2. hinnata RV infektsiooni mõju miR-146 perekonna ekspressioonile inimese bronhiepiteeli rakkudes
3. välja selgitada, kas ja kuidas mõjutab miR-146a/b tase interleukiin-1 perekonna geenide ekspressiooni rinoviirusega nakatunud bronhiepiteeli rakkudes
4. teha kindlaks IL-1 perekonna ekspressioon hiire hingamisteedes rinoviirusinfektsiooni korral ning analüüsida selle sõltuvust miR-146a/b ekspressioonist

### 2.2. Materjal ja metoodika

#### 2.2.1. Inimese bronhiepiteeli rakkude kasvatamine ja paljundamine

Primaarsed inimese bronhiepiteeli rakud olid kingitus Poola koostööpartnerite poolt (Bogdan Jakiela, Jageilloni Ülikool, Krakow, Poola). Eksperimentides kasutati 27-aastaselt astmat mitte põdevat meessoost doonorilt ja 30-aastaselt mitteastmaatilisel naissoost doonorilt kogutud passaaž 4 bronhiepiteeli rakke.

Rakkude kasvatamine toimus BEGM<sup>TM</sup> Bulletkit<sup>TM</sup> (*Bronchial Epithelial Cell Growth Medium*, Lonza, Šveits) söötmes, kus olid lisanditena veise ajuripatsi ekstrakt (BPE, *Bovine pituitary extract*), inimese epidermaalne kasvufaktor (hEGF) (1:1000), hüdrokortisoon (1:1000), retinoolhape (1:1000), insuliin (1:1000), trijoodtrüoniin (1:1000), gentamütsiin ja amfoteritsiin-B (1:1000), transferriin (1:1000), epinefriin (1:1000). Tootja ei ole avalikustanud söötme koostisosade täpset kontsentratsiooni. Rakke kasvatati 37°C juures keskkonnas, mis sisaldas 5% CO<sub>2</sub> ja oli veeauruga küllastatud. 10 cm diameetriga tassilt rakkude ümber plaatimiseks eemaldati rakkudelt sööde ja lisati 2 ml trüpsiini (Trypsin-EDTA in PBS, GE Healthcare, UK), millele järgnes inkubatsioon 5 minutit 37°C juures. Trüpsiini toime pidurdamiseks kasutati 4 ml trüpsiini neutraliseerivat lahust (Trypsin Neutralizer Solution, Invitrogen, USA). Rakud koguti 15 ml tuubi

ning kõikide rakkude kätte saamiseks pesti tassi 5ml PBS-ga. Rakke tsentrifuugiti toatemperatuuril 5 minutit 250 rcf juures, eemaldati supernatant ja rakkude suspendeerimiseks lisati 10 ml BEGM söödet. Rakud plaaditi vastavalt vajadusele, kontrolliti mikroskoobi all ning pandi inkubaatorisse.

### **2.2.2. HBEC rakkude stimuleerimine rinoviirustega**

Eksperimentides kasutati rinoviiruseid 1B ja A16, mis olid kingitus koostööpartnerilt Sebastian L. Johnstonilt (National Heart and Lung Institute, Imperial College London, UK). Nakatuskordsuse (MOI) arvutamisel eeldati, et MOI 1-le vastas  $1e^6$  rakkudele lisatud 0,1 ml viiruslahust, mille TCID<sub>50</sub> väärtus on  $1e^7$ . 24h enne katset jagati HBEC rakud 12 kannusele plaadile, ligikaudu 30 000 rakku kannu kohta. Seejärel eemaldati rakkudelt vana sööde ning lisati värsket. Sellele järgnes rinoviiruse stimulatsioon, mille käigus lisati rakkude söötmesse RV A16 või RV 1B (MOI 0,1 kontsentratsioonis) ning rakke inkubeeriti 24h või 48h 37°C juures. Negatiivse kontrollina kasutati „mock“ lahust ehk viiruspartikliteta HeLa rakkude kasvusöödet.

### **2.2.3. HBEC rakkude transfektsioon miRNA miimidega**

Päev enne transfektsiooni külvati rakud 12 kannusele plaadile, ühes kannus oli umbes 40 000 rakku. MiR-146a miimi (20 µM, DharmaconTM, USA) või negatiivse kontroll-miR miimi (20 µM, DharmaconTM, USA) transpordiks rakku kasutati peptiidi PepFect14 (100 µM). Iga kannu kohta segati rakkude transfektsiooniks 93,38 µl vett, 1,5 µl miR-146a või kontroll-miR miimi ja 5,12 µl peptiidi (2:1 suhtes). Saadud segu mikroRNA miimide lõppkontsentratsioon oli 30nM. Transfektsioonisegu inkubeeriti 1h toatemperatuuril ja seejärel lisati 900 µl söödet. Rakkudelt eemaldati olemasolev sööde, asendati transfektsiooniseguga ja rakke inkubeeriti 24h 37°C juures. 24h möödudes sööde eemaldati, rakke pesti PBS-ga.

### **2.2.4. Rinoviiruse indutseeritud hiire hingamisteede põletiku mudel**

C57Bl/6J metsiktüüpi hiired soetati Jackson Laboratory's asutusest (Bar Harbor, US). C57Bl/6J miR-146a/b<sup>-/-</sup> hiirte aretus (Hermann *et al.*, 2017) ja genotüpiseerimine viidi läbi Tartu Ülikooli Katseloomakeskuses. RV indutseeritud hiire hingamisteede põletiku saavutamiseks manustati isofluoraaniga (1,5–2,5% isofluraani 1,5l/min meditsiinilises hapnikus) kergelt anesteseeritud hiirtele intranasaalselt 40 µl RV 1B ( $7,78 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>) või 40 µl PBS kontrollina. 24h peale RV või PBS-i manustamist hiired surmati CO<sub>2</sub> üledoosiga ning seejärel koguti hiirtelt vasakpoolne kopsusagar RNA eralduseks.

Katsed viis läbi loomkatsekursuse läbinud E. Urgard Euroopa Parlamendi ja Euroopa Nõukogu 2010/63/EL-i direktiiviga vastavuses oleva Eesti Vabariigi Põllumajandusministeeriumi loa alusel (01.03.2018, litsents nr 117). Hiire kopsudest RNA eraldamise teostas A. Kivihall bakalaureusetööle eelnevalt, RT-qPCR ja tulemuste analüüs viidi läbi käesoleva bakalaureusetöö raames.

#### **2.2.5. RNA eraldamine**

HBEC rakkudest RNA eraldamiseks kasutati Total RNA Zol-Out komplekti (A&A Biotechnology, Poola). Peale rakkudelt söötme eemaldamist ja PBS-ga pesemist lisati 500 µl QIAzol lüüsilahust (Qiagen, Saksamaa), rakulüsaat koguti tuubidesse ja seejärel lisati proovidele 110 µl kloroformi, segati 15 sekundit üle korgi pöörates, inkubeeriti 3 minutit toatemperatuuril ja tsentrifuugiti 15 minutit 12 000 rcf 4°C juures (Eppendorf 5424 R, FA45-24-11 rootor, Saksamaa). Pealmine vesifaas tõsteti uude tuubi, lisati 600 µl isopropanooli, segati mitu korda üle korgi pöörates ning kanti minikolonnidele. Edasi töötati tootjapoolse protokoll järgi (A&A Biotechnology, Poola). RNA elueeriti 40 µl milliQ vees ning RNA kontsentratsiooni ja puhtust mõõdeti NanoDrop 2000c spektrofotomeetriga (Thermo Scientific, USA).

#### **2.2.6. RT-qPCR mRNA ekspressiooni uurimiseks**

RT-qPCR (reverse transcription quantitative polymerase chain reaction) meetodiga RNA ekspressiooni uurimiseks sünteesiti RNA ahelale komplementaarne DNA ehk cDNA. Selleks segati jään 96 kannuga plaadil kokku 1 µl Oligo(dT)<sub>18</sub> praimerit (TAG Copenhagen, Taani), 2 µl nukleotiidide segu (Thermo Scientific, USA) ja 11,5 µl RNA-d. Järgnes kuumutamine 5 minutit 65°C juures ning plaat tõsteti tagasi jääle. Segudele lisati 4 µl RT puhvrit, 0,5 µl RNAasi inhibiitorit (Thermo Scientific, USA) ja 0,5 µl RT ensüümi. Plaat asetati termotsüklerisse Mastercycler® nexus (Eppendorf, Saksamaa), kus proove hoiti 1 tund 42°C juures ning veel 10 minutit 75°C juures. 500 µl lõppruumala saamiseks lisati cDNA-le milliQ vett, seejärel jätkati proovidega töötamist või neid säilitati -20°C juures.

cDNA analüüsimiseks segati iga kannu kohta 2,6 µl milliQ vett, 1 µl 4 µM F+R praimeride segu (tabel 1) (TAG Copenhagen, Taani) ja 2,4 µl 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR segu (Solis Biodyne, Eesti). Reaktsioonisegu kanti 384 kannuga plaadile, kus igasse kannu lisati 6 µl cDNA-d. Plaat asetati masinasse ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA), mille programm on välja toodud tabelis 2. Iga cDNA proov oli plaadil kolmes korduses ning

inimese geeniekspressiooni normaliseerimiseks kasutati referentsgeeni EF1A, hiire geeniekspressiooni normaliseeriti Hprt suhtes.

**Tabel 1.** Kasutatud praimerid

Praimer		Järjestus
hEF1A	F	CCACCTTTGGGTCGCTTTGCTGT
	R	TGCCAGCTCCAGCAGCCTTCTT
hIL-1 $\alpha$	F	GCTGAAGGAGATGCCTGAGATA
	R	ACAAGTTTGGATGGGCAACTG
hIL-1 $\beta$	F	AGAAGTACCTGAGCTCGCCA
	R	TGGAAGGAGCACTTCATCTGT
hIL-1Ra	F	CCCCATGGCTTTAGAGACGA
	R	CCCAGATTCTGAAGGCTTGC
hIL-36 $\alpha$	F	GGACCGTATGTCTCCAGTCAC
	R	TCCATTTCAGGCCCAGGTAGA
hIL-36 $\beta$	F	GGTTTACCTGGGAATCAAGGGA
	R	TTATCTTGGGAGCCCTGAAGC
hIL-36 $\gamma$	F	GGTGCTGAGACAACCACACT
	R	ACAGCAACAGTGATTGATTGATAGA
hIL-36Ra	F	TTGGAGGAACAGGCAGACTC
	R	GTCCTTCATTCGGAAGCACAG
hIL-18	F	CTGCAGTCTACACAGCTTCGGG
	R	TCCTGCGACAAATAGTTTGTTGC
hIL-33	F	GACTCCTCCGAACACAGAGC
	R	TGCTGTGGAAATTTGTTGGTTG
hIL-37	F	CTTAGAAGACCCGGCTGGAAG
	R	CTTCACCTTTGGACTTGTGTGA
hIL-38	F	CTACAGCTGGAGGATGTGAAC
	R	GAAGAAGGTGAAGCGTGTGG



mHPRT	F	GACTTTGCTTTCCTTGGTCAGG
	R	AGTCTGGCTTATATCCAACACTTCG
mIL-1 $\alpha$	F	TCGGGAGGAGACGACTCTAA
	R	TTCTGGCAACTCCTTCAGCAA
mIL-1 $\beta$	F	TGAAGAAGAGCCCATCCTCTG
	R	GGAGCCTGTAGTGCAGTTGT
mIL-1Ra	F	ACCTGAGAAACAACCAGCTCA
	R	AGGCACCATGTCTATCTTTTCTTCT

**Tabel 2.** mRNA RT-qPCR programm

Etapp	Temperatuur (°C)	Kestvus	Korduste arv
Ensüümi aktivatsioon	95	15 min	1
Denaturatsioon	95	15 sek	40
Produkti paljundamine	60	1 min	
Dissotsiatsioon	95	15 sek	1
	60	1 min	
	95	15 ek	

### 2.2.7. RT-qPCR miRNA ekspressiooni uurimiseks

Sarnaselt mRNA-le sünteesiti ka mikroRNA-de ekspressiooni uurimiseks nendele komplementaarne DNA, kasutades miR-146a, miR-146b või let-7a spetsiifilisi primereid (5x TaqMan® MicroRNA Assay (Life Technologies, US)). Täpsemalt, lisati jää peal hoitud 96 kannuga plaadi igasse kannu tabelis 3 toodud komponendid. Järgnes inkubatsioon termotsükleris Mastercycler® nexus (Eppendorf, Saksamaa), kus proove töödeldi järgmiselt: 30 minutit 16°C, 30 minutit 42°C ja 10 minutit 85°C. Proovid säilitati -20°C juures.

**Tabel 3.** Reaktsioonisegu koostis

Komponent	Kogus (µl) 1 proovi kohta
dNTP segu (100 mM)	0,028
RT ensüüm (100 µM)	0,2
RT puhver (10x)	0,6

RNAasi inhibiitor	0,1
MilliQ vesi	2,07
RT praimer (5x)	1
RNA proov	2

Saadud cDNA-ga tehti RT-qPCR, kasutades masinat ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA). Selleks lisati 96 kannuga plaadil olevale cDNA-le reaktsioonisegu, mille koostises oli 4,4 µl 5x HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus segu (Solis Biodyne, Eesti), 11,6 µl milliQ vesi ja 1 µl 20x miR-146a, miR-146b või let-7a TaqMan® MicroRNA Assay (Life Technologies, USA). Segu jaotati 384 kannuga plaadile kahe kordusena, mõlemas kannus 10 µl. Seejärel asetati plaat ViiA 7 masinasse, mille programm on välja toodud tabelis 7. Tulemuste normaliseerimiseks kasutati referentsgeeni let-7a.

**Tabel 7.** miRNA RT-qPCR programm

Etapp	Temperatuur (° C)	Kestvus	Korduste arv
Ensüümi aktivatsioon	95	15 min	1
Denaturatsioon	95	15 sek	40
Produkti paljundamine	60	1 min	

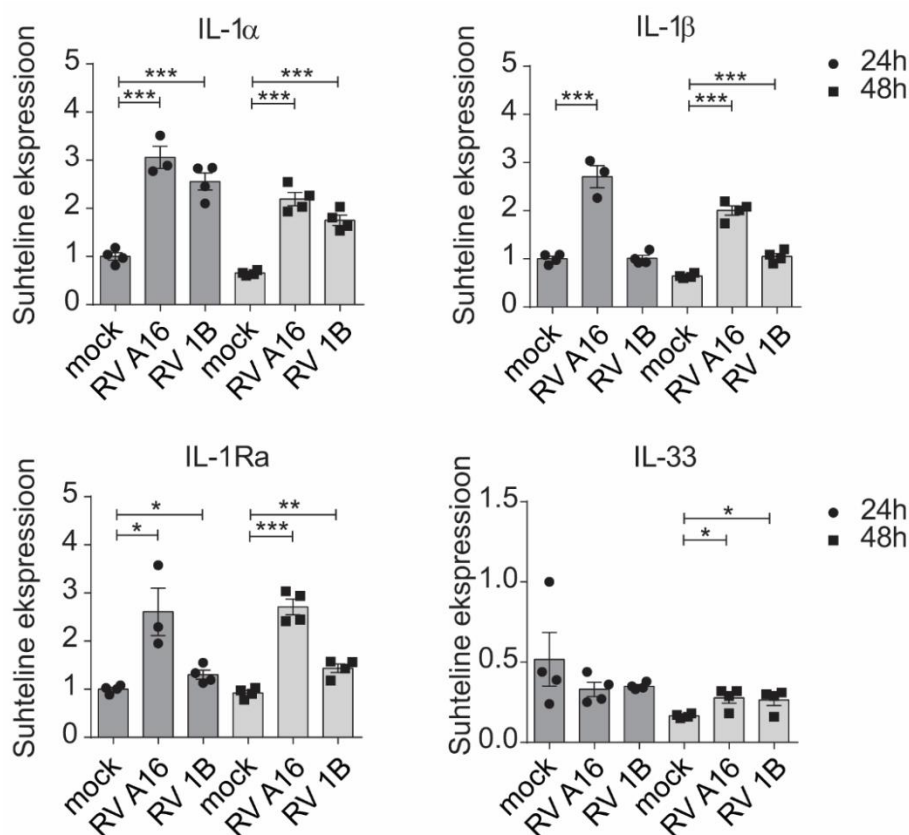
#### 2.2.8. Statistiline analüüs

Statistiliseks analüüsiks kasutati programmi GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc, USA). Tulemusi võrreldi kasutades kahepoolset Student t-testi ning joonistel on välja toodud ka standardvead (SEM, *Standard Error of the Mean*). Statistiliselt oluliseks arvestati tulemused, mille korral P-väärtus oli väiksem kui 0,05. P-väärtuste tähistused joonistel: \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ . *Heatmap*i tegemiseks kasutati veebitarkvara Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>).

## 2.3. Tulemused

### 2.3.1. Rinoviirused stimuleerivad IL-1 perekonna geeniekspressiooni HBEC rakkudes.

Käesoleva töö esimese ülesandena uuriti, kuidas mõjutab rinoviirus A16 või 1B infektsioon IL-1 perekonna geeniekspressiooni inimese primaarsetes bronhiepiteeli rakkudes. Geeniekspressiooni analüüsi tulemusena selgus, et nii RV A16 kui ka RV 1B tüvi stimuleerisid bronhiepiteeli rakkudes IL-1 $\alpha$  ekspressiooni. Suurenenud IL-1 $\alpha$  ekspressioon tuvastati nii 24 tunnise rinoviiruse stimulatsiooni korral, kui ka 48 tundi peale infektsiooni. IL-1 $\beta$  ekspressioon suurenes vastusena RV A16 nakkusele 24h ja 48h ajapunktis, kuid RV 1B stimulatsiooni korral tuvastati suurenenud IL-1 $\beta$  tase ainult 48 tundi peale infektsiooni (Joonis 4).

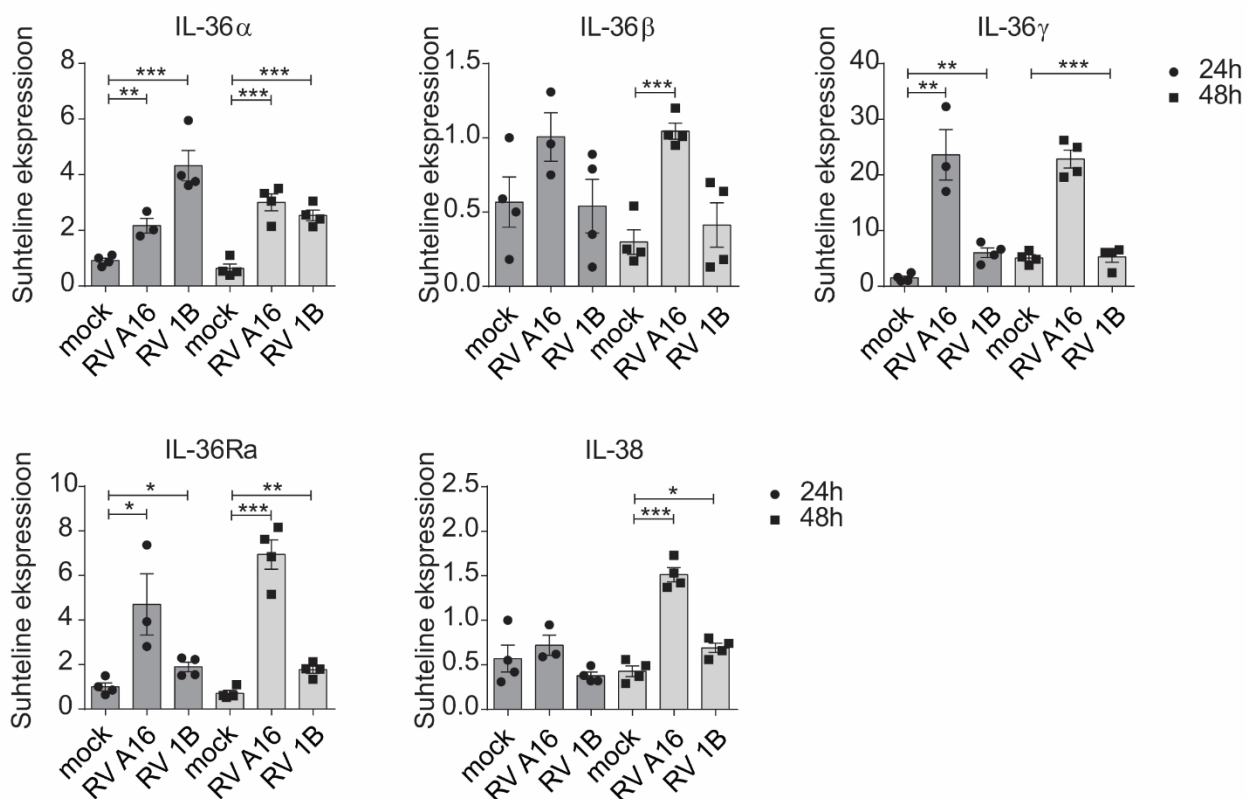


**Joonis 4. IL-1 alamperekonna geeniekspressioon HBEC rakkudes RV infektsiooni korral.**

HBEC rakke stimuleeriti 24 või 48 tundi (24h või 48h) rinoviirusega A16 või 1B. IL-1 alamperekonna geeniekspressiooni tase määrati RT-qPCR-i abil ja tulemused normaliseeriti koduhoidja geeni EF1A ja *mock* suhtes. Graafikutel on tulemused esitatud koos standardveaga. Statistilise olulisuse leidmiseks kasutati Student t-testi, \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ .  $N=4$ .

Sarnaselt IL-1 $\alpha$  ekspressioonile stimuleerisid mõlemad RV tüved IL-1Ra ekspressiooni bronhiepiteeli rakkudes ning võrreldes negatiivse kontrolli proovidega oli IL-1Ra avaldumine suurenenud nii 24h kui ka 48h ajapunktis. IL-1 alamperekonda kuuluva IL-33 tase ei muutunud RV nakkuse korral 24 tunni ajapunktis, kuid 48h peale RV A16 või 1B stimulatsiooni esines HBEC rakkudes suurenenud IL-33 ekspressioon (Joonis 4).

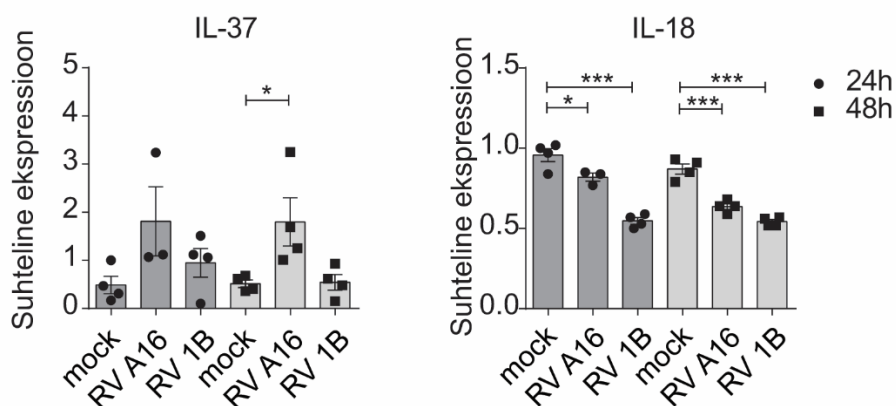
Järgmisena analüüsiti RV infektsiooni mõju IL-36 alamperekonna geeniekspressioonile HBEC rakkudes (Joonis 5). IL-36 $\alpha$  oli üles reguleeritud mõlema RV korral, kuid IL-36 $\beta$  ekspressioon suurenes ainult RV A16 48 tunnise infektsiooniga. RV A16 24 tunnise nakkuse ja RV 1B puhul ei olnud tulemused statistiliselt olulised. IL-36 $\gamma$  ekspressioon suurenes nii RV A16 kui RV 1B infektsiooniga, kuid RV 1B 48 tunnise nakkusega ei olnud muutust näha.



**Joonis 5. RV nakkus stimuleerib IL-36 alamperekonna geeniekspressiooni HBEC rakkudes.** HBEC rakkudele lisati rinoviirus A16 või 1B. 24 või 48 tundi hiljem määrati IL-36 alamperekonna geeniekspressiooni tase kasutades RT-qPCR-i ning tulemused normaliseeriti koduhoidja geeni EF1A ja *mock* suhtes. Tulemused on graafikutel kujutatud standardveaga. Tulemuste statistiliseks analüüsiks kasutati Student t-testi, \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ . N=4.

IL-36Ra oli üles reguleeritud vastusena mõlemale rinoviirusele mõlemas ajapunktis, kuid ekspressioon oli suurem 48 tundi peale infektsiooni. IL-38 tase ei muutunud 24 tunnises ajapunktis. IL-38 ekspressioon suurenes 48 tundi peale nakkust mõlema rinoviirusega (Joonis 5).

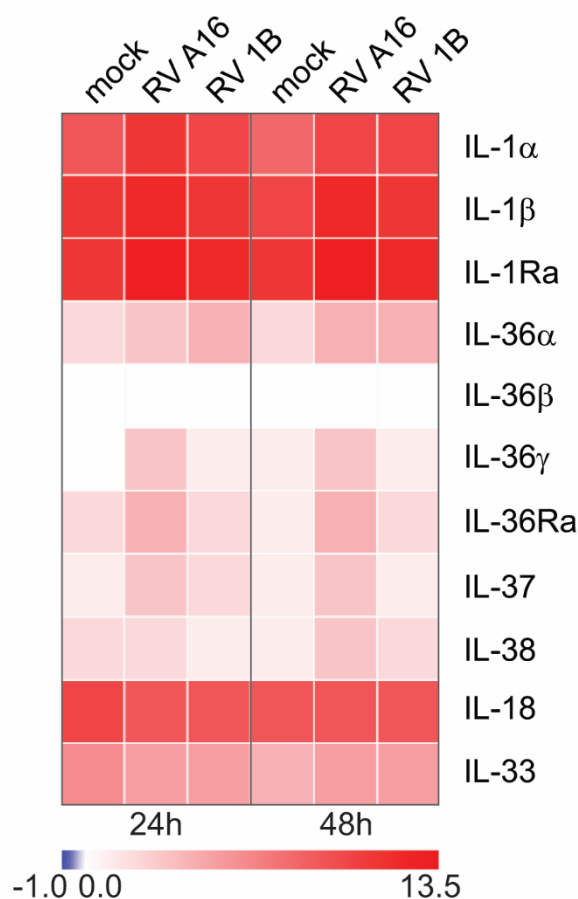
Viimasena analüüsiti, kas IL-18 alamperekonna geeniekspressioon muutub RV infektsiooni korral HBEC rakkudes. Tulemusena selgus, et IL-37 avaldumise tase ei muutunud HBEC rakkudes 24 tunnise RV stimulatsiooni korral, kuid 48 tundi peale RV A16-ga nakatamist tuvastati kergelt suurenenud IL-37 ekspressioon. Vastupidiselt kõikidele teistele IL-1 perekonna liikmetele tuvastati, et RV infektsiooni korral IL-18 ekspressioon väheneb ning seda nii RV A16 kui ka 1B nakkuse puhul. Inhibeeritud IL-18 ekspressioon leiti mõlemas analüüsitud ajapunktis (Joonis 6).



**Joonis 6. IL-18 alamperekonna ekspressioon on rinoviirusinfektsiooni korral HBEC rakkudes muutunud.** RV A16 või 1B lisati HBEC rakkudele 24 või 48 tunniks ja seejärel tuvastati IL-18 alamperekonna geeniekspressioon RT-qPCR meetodil ning tulemused normaliseeriti koduhoidja geeni EF1A ja *mock* suhtes. Graafikutel on tulemused kujutatud standardveaga. Statistiline analüüs viidi läbi kasutades Student t-testi, \*  $P < 0,05$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ .  $N=4$ .

Kokkuvõttes selgus RT-qPCR tulemustest, et rinoviirusinfektsioon mõjutas kõikide IL-1 perekonna geenide ekspressiooni bronhiepiteeli rakkudes. Et saada ülevaade, milline on IL-1 perekonna liikmete geeniekspressiooni tase üksteise suhtes RV nakkuse ajal HBEC rakkudes, normaliseeriti iga geeni ekspressioonitase madalaimalt avaldunud geeni IL-36 $\beta$  suhtes ning tulemuste visualiseerimiseks koostati *heatmap* (Joonis 7).

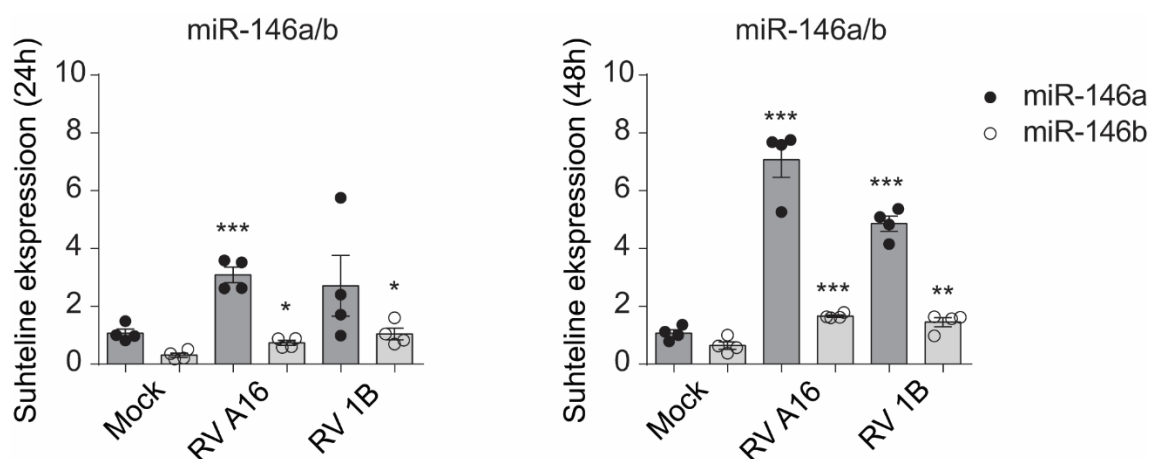
Joonis 7 on näha, et bronhiepiteeli rakkudes olid kõige kõrgemalt ekspresseerunud IL-1 alamperekonda kuuluvad IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ja IL-1Ra geenid. IL-33 ekspressioon HBEC rakkudes oli võrreldes ülejäänud IL-1 alamperekonna geenidega tunduvalt madalam. Samuti oli bronhiepiteeli rakkudes suhteliselt kõrgelt avaldunud IL-18 ekspressioon, kuid tase jäi madalamaks kui IL-1 alamperekonna geenide oma. Kõige madalamalt olid HBEC rakkudes ekspresseeritud IL-36 alamperekonna geenid.



**Joonis 7. Rinoviirus A16 ja 1B infektsiooni mõju IL-1 perekonna geeniekspressioonile HBEC rakkudes.** HBEC rakke stimuleeriti 24 või 48 tundi rinoviirusega A16 või 1B. Geeniekspressioon tuvastati RT-qPCR meetodil ning tulemused normaliseeriti koduhoidja geeni EF1A ja IL-36 $\beta$  *mock* (=1) suhtes. Suhteline ekspressioon on kujutatud log2 skaalal *heatmap*-na.

### 2.3.2. RV infektsioon bronhiepiteeli rakkudes stimuleerib miR-146a/b ekspressiooni

Lisaks analüüsi, kas ja kuidas mõjutavad rinoviirused miR-146 perekonna ekspressiooni HBEC rakkudes. Leiti, et võrreldes negatiivse kontrolli *mock* proovidega oli miR-146a ekspressioon vastusena RV A16 nakkusele 24h ajapunktis suurenenud ning mõlemad RV-d stimuleerisid miR-146a ekspressiooni 48h ajapunktis. miR-146b ekspressioon muutus mõlema RV tüve stimulatsiooni korral ning oli oluliselt kõrgem nii 24h kui 48h ajapunktis (Joonis 8).

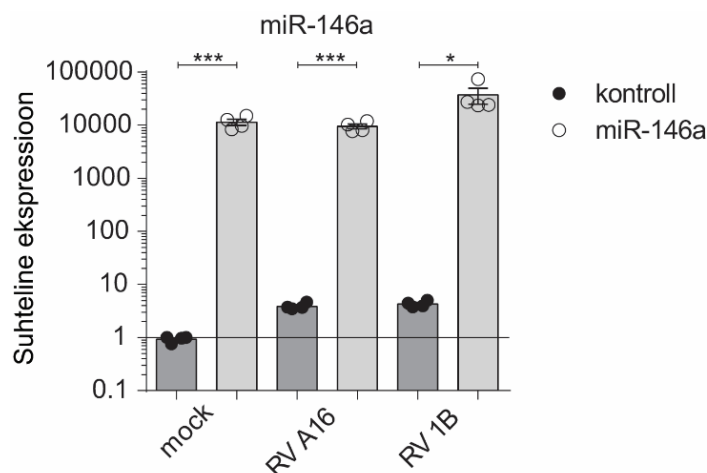


**Joonis 8. miR-146ab ekspressioon bronhiepiteeli rakkudes RV infektsiooni korral.** HBEC rakkudele lisati RV A16 või 1B 24 või 48 tunniks. Geeniekspressioon tuvastati RT-cPCR meetodil ning tulemused normaliseeriti referentsgeeni *let-7a* suhtes. Statistiliseks analüüsiks kasutati Student t-testi, \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ .  $N=4$ .

Saadud tulemused näitasid, et rinoviirus A16 ja 1B põhjustasid HBEC rakkudes suurenenud IL-1 perekonna ja miR-146a/b ekspressiooni ning IL-1 geenidest avaldusid bronhiepiteeli rakkudes kõige kõrgemalt IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ja IL-1Ra geenid, mistõttu keskenduti edasistes katsetes vaid nende geenide uurimisele seoses RV infektsiooniga.

### 2.3.3. miR-146a reguleerib RV indutseeritud IL-1 perekonna geeniekspressiooni

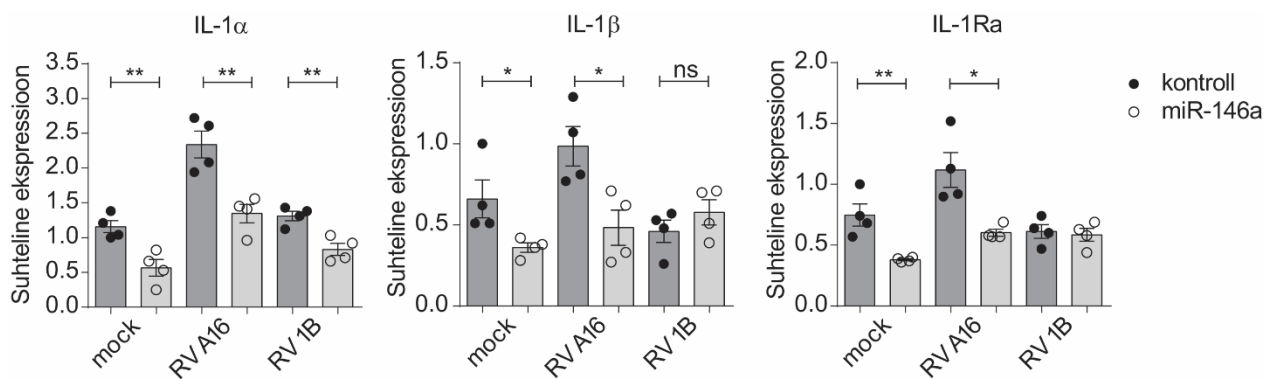
Järgmisena sooviti kindlaks teha, kas miR-146a osaleb RV stimuleeritud IL-1 alamperekonna ekspressiooni regulatsioonis HBEC rakkudes. Selleks transfekteeeriti HBEC rakke 24 tundi miR-146a ja negatiivse kontrolli miRNA-ga ning seejärel stimuleeriti rakke 48 tundi rinoviirus A16 või 1B-ga (Joonis 9). MiR-146a miimidega transfekteeeritud HBEC rakkudes tuvastati märkimisväärselt suurem miR-146a ekspressioon, võrreldes kontrolli miRNA miimidega transfekteeeritud rakkudega.



**Joonis 9. miR-146a miimide transfekteeimine HBEC rakkudesse on efektiivne.** Rakke transfekteeiti 24 tundi miR-146a miimi (miR-146a) või kontroll-miRNA-ga (kontroll) kasutades peptiidi PepFect14. Peale transfektsiooni sööde asendati ning järgnes rinoviirusinfektsioon 48 tundi rinoviirusega A16 või 1B. Geeniekspressioon tuvastati RT-cPCR meetodil ning tulemused normaliseeriti referentsgeeni let-7a ning kontroll miRNA miimiga transfekteeitud, *mock* stimuleeritud rakkude (=1) suhtes. Statistiliseks analüüsiks kasutati Student t-testi, \*  $P < 0,05$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ . N=4.

Seejärel analüüsiti miRNA miimidega transfekteeitud ja RV-ga stimuleeritud HBEC rakkudes IL-1 alamperekonna ekspressiooni (Joonis 10). Tulemusena selgus, et miR-146a transfekteeitud HBEC rakkudes oli võrreldes kontroll-transfekteeitud rakkudega IL-1 $\alpha$  ekspressioon vähenenud ning madalam IL-1 $\alpha$  tase tuvastati nii *mock*, RV A16 kui ka RV 1B töödeldud HBEC rakkudes. Ka IL-1 $\beta$  ja IL-1Ra ekspressioon langes miR-146a transfekteeitud HBEC rakkudes nii negatiivses kontrollis kui ka rinoviirus A16 infektsiooni korral (Joonis 10). IL-1 $\beta$  ekspressioonitase suurenes RV 1B infektsiooni korral, kuid muutus ei olnud statistiliselt oluline, ning ka miR-146a transfekteeimine RV 1B stimulatsiooni korral ei avaldanud IL-1 $\beta$  ekspressioonile mõju. MiR-146a miimide transfekteeimine HBEC rakkudesse ei mõjutanud ka IL-1Ra taset rinoviirus 1B nakkuse ajal võrreldes kontroll transfektsiooniga.





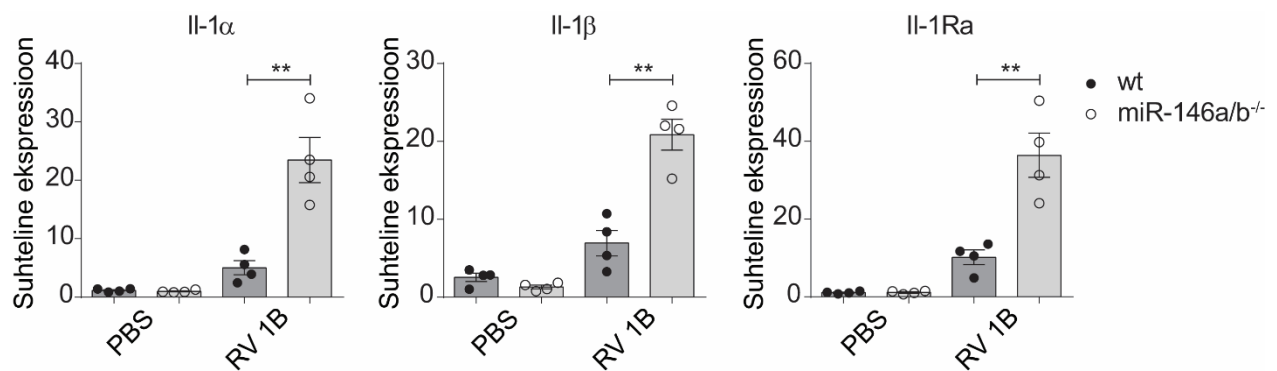
**Joonis 10. miR-146a transfektsiooni mõju IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ja IL-1Ra geeniekspressioonile HBEC rakkudes rinoviirusinfektsiooni korral.** Rakke transfekteeeriti 24 tundi miR-146a miimi (miR-146a) või kontroll-miRNA-ga (kontroll). Peale transfektsiooni asendati sööde ja rakke stimuleeriti 48 tundi rinoviirusega A16 või 1B. Geeniekspressioon leiti RT-qPCR-i abil ja tulemused normaliseeriti koduhoidja geeni EF1A ja negatiivse kontroll-miRNA suhtes. Statistilise olulisuse leidmiseks kasutati Student t-testi, \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; ns – pole statistiliselt oluline. N=4

Need tulemused näitasid, et miR-146a miimide transfekkeerimine HBEC rakkudesse enne RV infektsiooni aitab inhibeerida IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ja IL-1Ra geenide ekspressiooni.

#### 2.3.4. miR-146a/b<sup>-/-</sup> hiirtel on RV nakkuse korral IL-1 ekspressioon kopsus suurenenud

Eelmises *in vitro* katses leiti, et miR-146a osaleb IL-1 alamperekonna geeniekspressiooni reguleerimises rinoviirusinfektsiooni korral. Sellest lähtuvalt sooviti järgmisena uurida, kuidas mõjutab rinoviirus IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ja IL-1Ra geeniekspressiooni *in vivo*. Selleks kasutati varasemalt publitseeritud RV infektsiooni hiiremodelit (Bartlett *et al.*, 2008), kus C57Bl/6J metsiktüüpi (Wt) (ingl. *wild-type*) ja miR-146a/b<sup>-/-</sup> (*knock-out*) hiirtele manustati intranasaalselt füsioloogilist lahust või RV 1B ning 24h möödudes analüüsiti IL-1 perekonna tsütokiinide mRNA suhtelist taset hiirte kopsudest eraldatud RNA proovides (Joonis 11). Geeniekspressiooni analüüsi tulemusena selgus, et RV 1B nakkus stimuleerib, sarnaselt *in vitro* tulemustele, ka wt hiire kopsus nii IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  kui ka IL-1Ra ekspressiooni. Samuti analüüsiti, kas wt hiirte ja miR-146a/b<sup>-/-</sup> hiirte kopsudes esineb erinevusi IL-1 alamperekonna ekspressioonis. Tulemusena selgus, et hiirtel, kellel puudub miR-146a ja miR-146b ekspressioon, põhjustab rinoviirusinfektsioon kopsudes märkimisväärselt kõrgemat IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ja ka IL-1Ra ekspressiooni kui metsiktüüpi hiirtel. Kokkuvõttes selgus, et miR-146 perekonnal on oluline roll

IL-1 perekonna geenide IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ja IL-1Ra ekspressiooni regulatsioonis ning miR-146a/b puudumise korral on nimetatud geenid RV nakkuse korral kopsus kõrgemalt avaldunud.



**Joonis 11. Rinoviirus 1B mõju IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ja IL-1Ra geeniekspressioonile hiire hingamisteedes.** Wt ja miR-146a/b<sup>-/-</sup> hiirtele manustati intranasaalselt rinoviirus 1B või PBS. 24 tundi hiljem hiired surmati ning koguti nende vasakpoolne kopsusagar RNA eralduseks. Geeniekspressioon tuvastati RT-qPCR meetodil ning tulemused normaliseeriti koduhoidja geeni HPRT suhtes. Statistilise olulisuse leidmiseks kasutati Student t-testi, \*\* P < 0,01; N=4.

## 2.4. Arutelu

Astma on krooniline hingamisteede haigus, mille ägenemine on sageli põhjustatud rinoviirusinfektsioonist, kuid endiselt ei ole teada täpsed mehhanismid, mis viiruseid ja astmat seovad (Nicholson *et al.*, 1993, Lemanske ja Busse 2010, Han *et al.*, 2019). Lisaks on astma patsientidel täheldatud muutusi IL-1 perekonna tsütokiinide ekspressioonis, mida seostatakse hingamisteede põletikuga (Dinarello *et al.*, 2012, Rossios *et al.*, 2018), ning muutusi miR-146 perekonna avaldumises, mis on põletiku negatiivsed regulaatorid (Comer *et al.*, 2014). Käesolevas bakalaureusetöös uuriti IL-1 perekonna geeniekspressiooni inimese primaarsetes bronhiepiteeli rakkudes ja hiire hingamisteedes rinoviirusinfektsiooni korral ning miR-146a/b rolli IL-1 perekonna ekspressiooni regulatsioonis.

Töö *in vitro* eksperimentide tulemusena selgus, et rinoviirused A16 ja 1B stimuleerisid IL-1 perekonna geeniekspressiooni inimese primaarsetes bronhiepiteeli rakkudes ning need tulemused viitavad IL-1 perekonna geenide osalusele RV vastases viirusvastuses bronhiepiteelis. Samuti selgus meie tulemustest, et kõige kõrgemalt ekspresseerusid RV infektsiooni ajal IL-1 alamperekonna geenid. Sellest lähtuvalt on alust arvata, et IL-1 alamperekond, eriti IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ja IL-1Ra, omavad kõige suuremat rolli RV vastases viirusvastuses bronhiepiteelis. Seda kinnitavad ka varasemad publikatsioonid, mille kohaselt RV A16 infektsiooni tagajärjel suurenes IL-1 $\alpha$  sekretsioon *air-liquid-interface* kultuurina kasvatatud HBEC rakkudes (Hill *et al.*, 2016) ja RV 1B infektsiooni korral on leitud suurenenud IL-1 $\beta$  ekspressiooni BEAS2B rakkudes (Mehta *et al.*, 2018). Samuti leiti, et võrreldes 24h ajapunktiga oli 48h ajapunktis rohkemate IL-1 perekonna geenide ekspressioon mõjutatud ning miR-146a/b ekspressioon kõrgem. Sellest lähtuvalt võib arvata, et 24 tundi ei ole piisav rinoviiruse jõudmiseks epiteelrakkude tsütoplasmasse, maksimaalseks viiruse replikatsiooniks ja raku viirusvastuseks.

Katsetest, kus HBEC rakke transfekteeeriti miRNA miimidega ja nakatati seejärel rinoviirusega leiti, et miR-146a transfekteeeritud HBEC rakkudes oli IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ja IL-1Ra ekspressioonitase rinoviirus A16 infektsiooni korral statistiliselt oluliselt vähenenud võrreldes kontroll transfekteeeritud HBEC rakkudega. MiR-146a transfekteeeritud HBEC rakkudes vähenes IL-1 $\alpha$  ekspressioon ka RV 1B nakkuse korral, kuid IL-1 $\beta$  ja IL-1Ra ekspressiooni muutus ei olnud võrreldes kontroll-transfekteeeritud proovidega statistiliselt oluline. Samuti oli RV stimuleeritud miR-146a/b ekspressioon kõrgem RV A16 nakkuse korral võrreldes 1B tüvega, mis viitab, et RV A16 ja RV 1B avaldavad HBEC rakkudele erinevat mõju. Näiteks on leitud, et manustades

tsütokiini IL-1 $\beta$  on võrreldes metsiktüüpi hiirtega miR-146a<sup>-/-</sup> hiirtel suurenenud ICAM1, RV A16 retseptori, ekspressioon (Cheng *et al.*, 2013), mistõttu võib arvata, et miR-146a miime HBEC rakkudesse transfekteerides on ICAM1 ekspressioon alla surutud ning seetõttu nakatub vähem rakke RV A16-ga, mistõttu ka IL-1 alamperekonna geenide ekspressioon on võrreldes kontroll-transfekteeritud rakkudega madalam. Samuti on varasemates publikatsioonides näidatud, et rinoviirusinfektsiooniga kaasnevaid sümptomeid põhjustavad kopsudesse migreeruvad rakud nagu neutrofiilid, mis toodavad põletikulisi molekule (Mehta *et al.*, 2018). Kivihall *et al.*, uurimuses toodi välja neutrofiilide migreerumise vähenemine miR-146a üleekspressiooni korral, mis omakorda kinnitab miR-146a põletikuvastast rolli RV infektsiooni korral. Käesoleva bakalaureusetöö tulemused näitavad, et miR-146a reguleerib IL-1 perekonna taset rinoviirusinfektsiooni korral ning see on tõenäoliselt üks toimet mehhanismidest, mis viib põletikuliste protsesside leevendamisele. Lisaks on miR-146a antiinflammatoorset toimet täheldatud ka nahas, kus miR-146a surub alla psoriaasi (Hermann *et al.*, 2017) ja atoopilise dermatiidiga (Rebane *et al.*, 2014) kaasnevate põletikuliste geenide avaldumist keratinotsüütides. Kooskõlas meie tulemustega on näidatud miR-146a osalust IL-1 $\beta$  geeniekspressiooni reguleerimises ka inimese hingamisteede silelihasrakkudes (Comer *et al.*, 2014). Varem on täheldatud miR-146a üleekspressiooni korral vähenenud ning miR-146a inhibeerimise järel suurenenud NF- $\kappa$ B aktiivsust, kui HUVEC rakke stimuleeriti IL-1 $\beta$ -ga (Cheng *et al.*, 2013). Meie katsete tulemusena olid RV nakkuse tagajärjel IL-1 $\alpha$  ja IL-1 $\beta$  samal ajal ekspresseeritud antagonist IL-1Ra-ga ning nende kõikide geenide avaldumine oli miR-146a miimide transfektsiooni korral alla surutud, millest võib järeldada, et nende 3 geeni ekspressioon sõltub ühisest signaalirajast ja miR-146a reguleerib IL-1 perekonna geene kaudselt, näiteks NF- $\kappa$ B signaaliraja aktiivsust inhibeerides.

Lisaks analüüsiti IL-1 alamperekonna geenide ekspressiooni miR-146a/b puudumisel, kus miR-146a/b<sup>-/-</sup> hiirtele ja metsiktüüpi hiirtele manustati RV 1B, ning leiti, et miR-146a/b perekonna ekspressiooni puudumisel olid nii IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  kui ka IL-1Ra geenid hiire kopsus kõrgemalt ekspresseerunud kui metsiktüüpi hiirtel. Need tulemused on kooskõlas eelnevate *in vitro* tulemustega ning veelkord kinnitavad miR-146a/b ekspressiooni osalust IL-1 perekonna geenide regulatsioonis. Kokkuvõttes näitavad käesolevas bakalaureusetöös saadud tulemused, et miR-146a/b on vajalikud rinoviirusinfektsiooni indutseeritud IL-1 perekonna ekspressiooni reguleerimiseks ning miR-146a/b puudulikkus võib põhjustada hingamisteedes suuremat põletikku.

Lisaks on Han *et al.*, varasemalt näidanud, et rinoviirusinfektsioon on võimeline metsiktüüpi hiirte hingamisteedes inflammasoomi aktiveerimist põhjustama, mis omakorda väljendub hiire kopsudes suurenenud NLRP3 ja IL-1 $\beta$  ekspressioonina, kusjuures NLRP3<sup>-/-</sup> ja IL-1 $\beta$ <sup>-/-</sup> hiirtel oli samades tingimustes hingamisteede põletik minimaalne. Kuna miR-146a transfekteeimine HBEC rakkudesse inhibeeris IL-1 $\beta$  ekspressiooni ning miR-146a/b puudumisel esines hiire kopsudes suurenenud IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ja ka IL-1Ra ekspressioon, siis on võimalik, et miR-146 perekond osaleb RV indutseeritud inflammasoomi aktivatsiooni regulatsioonis, kuid selle kinnitamiseks on vajalikud edasised uuringud. Näiteks oleks vaja analüüsida IL-1 perekonna tsütokiinide ekspressiooni RV-ga nakatatud HBEC rakkude supernatandist valgu tasemel, kasutades ensüümseotud immuunsorbentanalüüsi (ELISA) (ingl *the enzyme-linked immunosorbent assay*), või analüüsida rakulüsaati Western blot meetodiga. Samuti võiks analüüsida inflammasoomi moodustavate geenide ekspressiooni HBEC rakkudes rinoviirusinfektsiooni korral ja seejärel uurida miR-146a miimide transfektsiooni mõju inflammasoomi geenidele RV nakkuse ajal. Lisaks saaks samade inflammasoomi geenide ekspressiooni analüüsida võrdlevalt ka RV-ga nakatunud metsiktüüpi ja miR-146a/b<sup>-/-</sup> hiirte kopsudes.

# KOKKUVÕTE

Astma on põletikuline hingamisteede haigus, mille ägenemine kaasneb tihti rinoviirusnakkusega (Lemanske ja Busse 2010, Han *et al.*, 2019). Interleukiin-1 (IL-1) on tsütokiinide perekond, mida seostatakse põletikuliste protsessidega. Astma haigetel on märgatud IL-1 perekonna geenide muutunud ekspressiooni hingamisteedes (Dinarello *et al.*, 2012, Rossios *et al.*, 2018). MikroRNA-d on ~22 nukleotiidi pikkused üheaahelalised RNA järjestused, mis osalevad posttranskriptsioonilises geeniregulatsioonis. Astma korral on leitud miR-146a/b taseme muutusi bronhiepiteeli rakkudes (Comer *et al.*, 2014, Rebane ja Akdis 2014, Hata ja Kashima 2016).

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk oli analüüsida interleukiin-1 perekonna geenide ja miR-146a/b perekonna ekspressiooni bronhiepiteeli rakkudes rinoviirusinfektsiooni korral ning välja selgitada, kuidas mõjutab miR-146a/b IL-1 perekonna ekspressiooni rinoviirusega nakatumisel bronhiepiteeli rakkudes. Lisaks uuriti IL-1 perekonna geenide taset metsiktüüpi ja miR-146a/b<sup>-/-</sup> hiirte hingamisteedes rinoviirusnakkuse korral.

Läbiviidud eksperimentide tulemused näitasid, et rinoviirusega nakatunud bronhiepiteeli rakkudes on suurenenud IL-1 perekonna geenide ja miR-146a/b ekspressioon. Samuti tuvastati, et miR-146a miimide transfekterimine bronhiepiteeli rakkudesse enne RV nakkust aitab vähendada IL-1 perekonna geenide IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ja IL-1Ra ekspressiooni. Need tulemused viitasid, et IL-1 perekonna ekspressioon on vajalik rakkude viirusvastuseks ning miR-146a/b on võimelised IL-1 perekonna geenide taset negatiivselt reguleerima. Selle hüpoteesi kinnitamiseks analüüsiti RV mõju *in vivo* ning tulemusena selgus, et RV infektsiooni korral esines miR-146a/b<sup>-/-</sup> hiirte kopsudes märkimisväärselt suurem IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ja IL-1Ra ekspressioon kui metsiktüüpi hiirte hingamisteedes. Kõiki neid tulemusi kokku võttes selgus käesoleva bakalaureusetöö raames, et miR-146a/b ekspressioon on RV nakkuse korral vajalik IL-1 perekonna geeniekspressiooni reguleerimiseks ning miR-146a/b puudulikkus võib põhjustada suuremat hingamisteede põletikku *in vivo*.

# **The effect of miR-146a/b on the expression of interleukin-1 family genes in bronchial epithelial cells during rhinovirus infection**

Mariel Mäe

## **Summary**

Asthma is a chronic respiratory disease that is often exacerbated by rhinovirus infection (Han *et al.*, 2019) (Lemanske and Busse, 2010). Interleukin-1 (IL-1) is a family of inflammatory cytokines and it has been noticed that the IL-1 family genes are differentially expressed in the airways of asthma patients (Dinareello *et al.*, 2012, Rossios *et al.*, 2018). MicroRNAs are short (~22 nucleotides) single-stranded RNA sequences that post-transcriptionally regulate gene expression and dysregulated expression of anti-inflammatory miR-146a/b has been detected in bronchial epithelial cells of asthma patients (Rebane and Akdis, 2014), (Hata and Kashima, 2016), (Comer *et al.*, 2014). Because of these findings, the aim of this Bachelor's thesis was to investigate the expression of IL-1 family genes and miR-146a/b expression during rhinovirus infection in bronchial epithelial cells and to analyse whether miR-146a/b are involved in the regulation of IL-1 family gene expression in bronchial epithelial cells and mouse airways during rhinovirus infection.

As results we show increased expression of IL-1 family genes and miR-146a/b genes during rhinovirus infection in primary bronchial epithelial cells when compared with control *mock* group. In addition, transfection of miR-146a mimics into bronchial epithelial cells revealed that miR-146a overexpression downregulates the IL-1 family genes IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-1Ra. Therefore, it is likely that the IL-1 family participates in the viral response against rhinovirus infection in bronchial epithelial cells and miR-146a acts as a negative regulator to rhinovirus infected IL-1 family genes.

To confirm this hypothesis, we next analysed the IL-1 family gene expression in the airways of wild-type and miR-146a/b<sup>-/-</sup> mice during rhinovirus infection and detected significantly higher expression of IL-1 family genes in the lungs of miR-146a/b<sup>-/-</sup> mice when compared to wild-type mice. Taken together, the results of this Bachelor's thesis revealed that miR-146a/b act as negative regulators of RV induced IL-1 family gene expression and miR-146a/b deficiency during RV infection might lead to more severe inflammation of the airways *in vivo*.

## TÄNUAVALDUSED

Soovin tänada oma juhendajat Anet Kivihalli, kes abistas katsete läbiviimisel ja tulemuste analüüsimisel ning andis bakalaureusetöö kirjutamisel pidevalt tagasisidet. Soovin tänada ka meie koostööpartnereid dr Bogdan Jakiela, dr Sebastian L. Johnston ja dr James E. Gern, kes kinkisid käesolevas bakalaureusetöös kasutatud primaarsed bronhiepiteeli rakud ja rinoviirused. Lisaks tänan oma juhendajat Mariliis Klaasi ja RNA bioloogia töögrupi liikmeid, kes mind õpetasid ja toetasid.



## KASUTATUD KIRJANDUS

Akdis, M., Aab, A., Altunbulakli, C., ... (2016). Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor beta, and TNF-alpha: Receptors, functions, and roles in diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **138**(4): 984-1010.

Altan-Bonnet, G. , Mukherjee, R. (2019). Cytokine-mediated communication: a quantitative appraisal of immune complexity. *Nature Reviews Immunology* **19**(4): 205-217.

Arukuusk, P., Parnaste, L., Margus, H., Eriksson, N. K. J., Vasconcelos, L., Padari, K., Pooga, M. , Langel, U. (2013). Differential Endosomal Pathways for Radically Modified Peptide Vectors. *Bioconjugate Chemistry* **24**(10): 1721-1732.

Bartlett, N. W., Walton, R. P., Edwards, M. R., ... (2008). Mouse models of rhinovirus-induced disease and exacerbation of allergic airway inflammation. *Nature Medicine* **14**(2): 199-204.

Becher, B., Spath, S. , Goverman, J. (2017). Cytokine networks in neuroinflammation. *Nature Reviews Immunology* **17**(1): 49-59.

Blaas, D. , Fuchs, R. (2016). Mechanism of human rhinovirus infections. *Molecular and Cellular Pediatrics* **3**(1): 21.

Bleecker, E. R., FitzGerald, J. M., Chanez, P., ... (2016). Efficacy and safety of benralizumab for patients with severe asthma uncontrolled with high-dosage inhaled corticosteroids and long-acting beta 2-agonists (SIROCCO): a randomised, multicentre, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet* **388**(10056): 2115-2127.

Carr, T. F., Zeki, A. A. , Kraft, M. (2018). Eosinophilic and Noneosinophilic Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **197**(1): 22-37.

Chang, P. J., Michaeloudes, C., Zhu, J., Shaikh, N., Baker, J., Chung, K. F. , Bhavsar, P. K. (2015). Impaired Nuclear Translocation of the Glucocorticoid Receptor in Corticosteroid-Insensitive Airway Smooth Muscle in Severe Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **191**(1): 54-62.

Cheng, H. S., Sivachandran, N., Lau, A., Boudreau, E., Zhao, J. L., Baltimore, D., Delgado-Olguin, P., Cybulsky, M. I. , Fish, J. E. (2013). MicroRNA-146 represses endothelial activation by inhibiting pro-inflammatory pathways. *Embo Molecular Medicine* **5**(7): 1017-1034.

Comer, B. S., Camoretti-Mercado, B., Kogut, P. C., Halayko, A. J., Solway, J. , Gerthoffer, W. T. (2014). MicroRNA-146a and microRNA-146b expression and anti-inflammatory function in human airway smooth muscle. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **307**(9): 727-734.

- Comer, B. S., Camoretti-Mercado, B., Kogut, P. C., Halayko, A. J., Solway, J. , Gerthoffer, W. T. (2014). MicroRNA-146a and microRNA-146b expression and anti-inflammatory function in human airway smooth muscle. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **307**(9): L727-L734.
- Croteau-Chonka, D. C., Qiu, W. L., Martinez, F. D., ... (2017). Gene Expression Profiling in Blood Provides Reproducible Molecular Insights into Asthma Control. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **195**(2): 179-188.
- Dagenais, M., Dupaul-Chicoine, J., Douglas, T., Champagne, C., Morizot, A. , Saleh, M. (2017). The Interleukin (IL)-1R1 pathway is a critical negative regulator of PyMT-mediated mammary tumorigenesis and pulmonary metastasis. *Oncoimmunology* **6**(3).
- Demarche, S., Schleich, F., Henket, M., Paulus, V., Van Hees, T. , Louis, R. (2016). Detailed analysis of sputum and systemic inflammation in asthma phenotypes: are paucigranulocytic asthmatics really non-inflammatory? *Bmc Pulmonary Medicine* **16**.
- Dinarello, C. A., Simon, A. , van der Meer, J. W. M. (2012). Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nature Reviews Drug Discovery* **11**(8): 633-652.
- Dowaidar, M., Gestin, M., Cerrato, C. P., ... (2017). Role of autophagy in cell-penetrating peptide transfection model. *Scientific Reports* **7**.
- El-Gammal, A., Oliveria, J. P., Howie, K., ... (2016). Allergen-induced Changes in Bone Marrow and Airway Dendritic Cells in Subjects with Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **194**(2): 169-177.
- Essilfie, A. T., Horvat, J. C., Kim, R. Y., ... (2015). Macrolide therapy suppresses key features of experimental steroid-sensitive and steroid-insensitive asthma. *Thorax* **70**(5): 458-U151.
- Fahy, J. V. (2015). Type 2 inflammation in asthma - present in most, absent in many. *Nature Reviews Immunology* **15**(1): 57-65.
- Froidure, A., Mouthuy, J., Durham, S. R., Chanez, P., Sibille, Y. , Pilette, C. (2016). Asthma phenotypes and IgE responses. *European Respiratory Journal* **47**(1): 304-319.
- Garbacki, N., Di Valentin, E., Huynh-Thu, V. A., ... (2011). MicroRNAs Profiling in Murine Models of Acute and Chronic Asthma: A Relationship with mRNAs Targets. *Plos One* **6**(1).
- Garlanda, C., Dinarello, C. A. , Mantovani, A. (2013). The Interleukin-1 Family: Back to the Future. *Immunity* **39**(6): 1003-1018.
- Gasiuniene, E., Janulaityte, I., Zemeckiene, Z., Barkauskiene, D. , Sitkauskiene, B. (2019). Elevated levels of interleukin-33 are associated with allergic and eosinophilic asthma. *Scandinavian Journal of Immunology* **89**(5).

- Gern, J. E. (2015). How rhinovirus infections cause exacerbations of asthma. *Clinical and Experimental Allergy* **45**(1): 32-42.
- Gestin, M., Helmfors, H., Falato, L., Lorenzon, N., Michalakis, F. I. , Langel, Ü. (2020). Effect of small molecule signaling in PepFect14 transfection. *PLOS ONE* **15**(1): e0228189.
- Girkin, J. L., Hatchwell, L. M., Collison, A. M., Starkey, M. R., Hansbro, P. M., Yagita, H., Foster, P. S. , Mattes, J. (2017). TRAIL signaling is proinflammatory and proviral in a murine model of rhinovirus 1B infection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **312**(1): 89-99.
- Han, M., Bentley, J. K., Rajput, C., ... (2019). Inflammasome activation is required for human rhinovirus-induced airway inflammation in naive and allergen-sensitized mice. *Mucosal Immunol* **12**(4): 958-968.
- Hansel, T. T., Tunstall, T., Trujillo-Torralbo, M. B., ... (2017). A Comprehensive Evaluation of Nasal and Bronchial Cytokines and Chemokines Following Experimental Rhinovirus Infection in Allergic Asthma: Increased Interferons (IFN-gamma and IFN-lambda) and Type 2 Inflammation (IL-5 and IL-13). *Ebiomedicine* **19**: 128-138.
- Hartung, D. M., Middleton, L., Markwardt, S., Williamson, K. , Ketchum, K. (2015). Changes in Long-acting beta-agonist Utilization After the FDA's 2010 Drug Safety Communication. *Clinical Therapeutics* **37**(1): 114-123.
- Hata, A. , Kashima, R. (2016). Dysregulation of microRNA biogenesis machinery in cancer. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **51**(3): 121-134.
- Heffler, E., Allegra, A., Pioggia, G., Picardi, G., Musolino, C. , Gangemi, S. (2017). MicroRNA Profiling in Asthma: Potential Biomarkers and Therapeutic Targets. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **57**(6): 642-650.
- Hermann, H., Runnel, T., Aab, A., ... (2017). miR-146b Probably Assists miRNA-146a in the Suppression of Keratinocyte Proliferation and Inflammatory Responses in Psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology* **137**(9): 1945-1954.
- Hill, A. R., Donaldson, J. E., Blume, C., ... (2016). IL-1 alpha mediates cellular cross-talk in the airway epithelial mesenchymal trophic unit. *Tissue Barriers* **4**(3).
- Hosokawa, H., Tanaka, T., Endo, Y., ... (2016). Akt1-mediated Gata3 phosphorylation controls the repression of IFN gamma in memory-type Th2 cells. *Nature Communications* **7**.
- Johnston, S. L., Pattemore, P. K., Sanderson, G., ... (1995). Community Study of Role of Viral-Infections in Exacerbations of Asthma in 9-11 Year-Old Children. *British Medical Journal* **310**(6989): 1225-1229.

- Kivihall, A., Aab, A., Soja, J., Sladek, K., Sanak, M., Altraja, A., Jakiela, B., Bochenek, G. , Rebane, A. (2019). Reduced expression of miR-146a in human bronchial epithelial cells alters neutrophil migration. *Clinical and Translational Allergy* **9**(1).
- Kobayashi, T., Iijima, K., Dent, A. L. , Kita, H. (2017). Follicular helper T cells mediate IgE antibody response to airborne allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **139**(1): 300-+.
- Kudo, M., Ishigatsubo, Y. , Aoki, I. (2013). Pathology of asthma. *Frontiers in Microbiology* **4**.
- Lee, H. S., Park, D. E., Lee, J. W., Sohn, K. H., Cho, S. H. , Park, H. W. (2020). Role of interleukin-23 in the development of nonallergic eosinophilic inflammation in a murine model of asthma. *Experimental and Molecular Medicine*.
- Lemanske, R. F. , Busse, W. W. (2010). Asthma: Clinical expression and molecular mechanisms. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125**(2): S95-S102.
- Lewis-Rogers, N., Seger, J. , Adler, F. R. (2017). Human Rhinovirus Diversity and Evolution: How Strange the Change from Major to Minor. *Journal of Virology* **91**(7).
- Li, X. M., Peng, J., Gu, W. , Guo, X. J. (2016). TCDD-Induced Activation of Aryl Hydrocarbon Receptor Inhibits Th17 Polarization and Regulates Non-Eosinophilic Airway Inflammation in Asthma. *Plos One* **11**(3).
- Liang, Y. X., Feng, Y. C., Wu, W. L., Chang, C. L., Chen, D. A., Chen, S. C. , Zhen, G. H. (2020). microRNA-218-5p plays a protective role in eosinophilic airway inflammation via targeting delta-catenin, a novel catenin in asthma. *Clinical and Experimental Allergy* **50**(1): 29-40.
- Maltby, S., Gibson, P. G., Powell, H. , McDonald, V. M. (2017). Omalizumab Treatment Response in a Population With Severe Allergic Asthma and Overlapping COPD. *Chest* **151**(1): 78-89.
- Margus, H., Arukuusk, P., Langel, U. , Pooga, M. (2016). Characteristics of Cell-Penetrating Peptide/Nucleic Acid Nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics* **13**(1): 172-179.
- Mehta, A. K., Doherty, T., Broide, D. , Croft, M. (2018). Tumor necrosis factor family member LIGHT acts with IL-1 and TGF- to promote airway remodeling during rhinovirus infection. *Allergy* **73**(7): 1415-1424.
- Mitchell, P. D. , O'Byrne, P. M. (2017). Epithelial-Derived Cytokines in Asthma. *Chest* **151**(6): 1338-1344.

- Newcomb, D. C., Sajjan, U. S., Nagarkar, D. R., ... (2008). Human rhinovirus 1B exposure induces phosphatidylinositol 3-kinase-dependent airway inflammation in mice. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **177**(10): 1111-1121.
- Nicholson, K. G., Kent, J. , Ireland, D. C. (1993). Respiratory Viruses and Exacerbations of Asthma in Adults. *British Medical Journal* **307**(6910): 982-986.
- Nouhin, J., Pean, P., Madec, Y., ... (2017). Interleukin-1 receptor antagonist, a biomarker of response to anti-TB treatment in HIV/TB co-infected patients. *Journal of Infection* **74**(5): 456-465.
- Orlowski, G. M., Colbert, J. D., Sharma, S., Bogyo, M., Robertson, S. A. , Rock, K. L. (2015). Multiple Cathepsins Promote Pro-IL-1 beta Synthesis and NLRP3-Mediated IL-1 beta Activation. *Journal of Immunology* **195**(4): 1685-1697.
- Pan, R., Xu, W., Ding, Y., Lu, S. , Chen, P. (2016). Uptake Mechanism and Direct Translocation of a New CPP for siRNA Delivery. *Molecular Pharmaceutics* **13**(4): 1366-1374.
- Park, H., Huang, X., Lu, C. M., Cairo, M. S. , Zhou, X. Z. (2015). MicroRNA-146a and MicroRNA-146b Regulate Human Dendritic Cell Apoptosis and Cytokine Production by Targeting TRAF6 and IRAK1 Proteins. *Journal of Biological Chemistry* **290**(5): 2831-2841.
- Pasi, S., Kant, R., Gupta, S. , Surolia, A. (2015). Novel multimeric IL-1 receptor antagonist for the treatment of rheumatoid arthritis. *Biomaterials* **42**: 121-133.
- Patel, S. G., Sayers, E. J., He, L., ... (2019). Cell-penetrating peptide sequence and modification dependent uptake and subcellular distribution of green fluorescent protein in different cell lines. *Scientific Reports* **9**.
- Paterson, M. R. , Kriegel, A. J. (2017). MiR-146a/b: a family with shared seeds and different roots. *Physiological Genomics* **49**(4): 243-252.
- Pfeiffer, D., Rossmanith, E., Lang, I. , Falkenhagen, D. (2017). miR-146a, miR-146b, and miR-155 increase expression of IL-6 and IL-8 and support HSP10 in an In vitro sepsis model. *Plos One* **12**(6).
- Plank, M. W., Maltby, S., Tay, H. L., Stewart, J., Eysers, F., Hansbro, P. M. , Foster, P. S. (2015). MicroRNA Expression Is Altered in an Ovalbumin-Induced Asthma Model and Targeting miR-155 with Antagomirs Reveals Cellular Specificity. *Plos One* **10**(12).
- Price, D. B., Colice, G., Israel, E., ... (2016). Add-on LABA in a separate inhaler as asthma step-up therapy &lt;em>&lt;/em>versus&lt;/em> increased dose of ICS or ICS/LABA combination inhaler. *ERJ Open Research* **2**(2): 00106-02015.

Rebane, A. , Akdis, C. A. (2014). MicroRNAs in Allergy and Asthma. *Current Allergy and Asthma Reports* **14**(4).

Rebane, A., Runnel, T., Aab, A., ... (2014). MicroRNA-146a alleviates chronic skin inflammation in atopic dermatitis through suppression of innate immune responses in keratinocytes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **134**(4): 836-U443.

Rossi, G. A. , Colin, A. A. (2015). Infantile respiratory syncytial virus and human rhinovirus infections: respective role in inception and persistence of wheezing. *European Respiratory Journal* **45**(3): 774-789.

Rossios, C., Pavlidis, S., Hoda, U., ... (2018). Sputum transcriptomics reveal upregulation of IL-1 receptor family members in patients with severe asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **141**(2): 560-570.

Sun, X., Hou, T., Cheung, E., ... (2019). Anti-inflammatory mechanisms of the novel cytokine interleukin-38 in allergic asthma. *Cell Mol Immunol.*

Sun, Y. L., Sun, Y. H. , Zhao, R. L. (2017). Establishment of MicroRNA delivery system by PP7 bacteriophage-like particles carrying cell-penetrating peptide. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **124**(2): 242-249.

Thurley, K., Gerecht, D., Friedmann, E. , Hofer, T. (2015). Three-Dimensional Gradients of Cytokine Signaling between T Cells. *Plos Computational Biology* **11**(4).

Urgard, E., Lorents, A., Klaas, M., ... (2016). Pre-administration of PepFect6-microRNA-146a nanocomplexes inhibits inflammatory responses in keratinocytes and in a mouse model of irritant contact dermatitis. *Journal of Controlled Release* **235**: 195-204.

van de Veerdonk, F. L. , Netea, M. G. (2013). New insights in the immunobiology of IL-1 family members. *Frontiers in Immunology* **4**.

Wilczynska, A. , Bushell, M. (2015). The complexity of miRNA-mediated repression. *Cell Death and Differentiation* **22**(1): 22-33.

Vos, W., Hajian, B., De Backer, J., ... (2016). Functional respiratory imaging to assess the interaction between systemic roflumilast and inhaled ICS/LABA/LAMA. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* **11**: 263-271.

Xiang, M., Birkbak, N. J., Vafaizadeh, V., ... (2014). STAT3 Induction of miR-146b Forms a Feedback Loop to Inhibit the NF-kappa B to IL-6 Signaling Axis and STAT3-Driven Cancer Phenotypes. *Science Signaling* **7**(310).

Yashiro, T., Kubo, M., Ogawa, H., Okumura, K. , Nishiyama, C. (2015). PU.1 Suppresses Th2 Cytokine Expression via Silencing of GATA3 Transcription in Dendritic Cells. *Plos One* **10**(9).

# LIHTLITSENTS

Mina, Mariel Mäe,

(sünnikuupäev: 10.11.1998)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

“miR-146a/b mõju interleukiin-1 perekonna geeniekspressioonile bronhiepiteeli rakkudes rinoviirusinfektsiooni korral”,

mille juhendajad on Anet Kivihall ja Mariliis Klaas,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Mariel Mäe

08.06.2020